

ESTUDO SÔBRE
PIROFOSFATASES INORGÂNICAS
ANIMAIS
POR
TUISKON DICK

Tese apresentada para o Concurso a Cátedra
de Química Orgânica e Biológica.
Faculdade de Filosofia.
Universidade do Rio Grande do Sul.

PÓRTO ALEGRE

1 9 6 1

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS
U.F.R.G.S.

ESTUDO SÔBRE
PIROFOSFATASES INORGÂNICAS
ANIMAIS
POR
TUISKON DICK

Tese apresentada para o Concurso a Cátedra
de Química Orgânica e Biológica.
Faculdade de Filosofia.
Universidade do Rio Grande do Sul.

P Ô R T O A L E G R E

1 9 6 1

A minha esposa

e meus filhos

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS
U.F.R.G.S.

Ficam aqui registrados os sinceros
agradecimentos do autor

- às Direções das Faculdades de Fi
losofia e de Medicina da Universidade do Rio Gr
ande do Sul, pelas possibilidades materiais e estí-
mulo constante demonstrados pelas mesmas no senti-
do do progresso da investigação bioquímica em nos-
so meio.

- ao Conselho Nacional de Pesqui--
sas, e particularmente ao Prof. Dr. Bernardo Gei-
sel, pela valiosa orientação e pelos auxílios para
investigação.

- ao Instituto de Pesquisas Veteriná-
rias Desidério Finamor, na pessoa de seu Diretor ,
Dr. Roberto Gloss, pelo fornecimento de animais e
inestimável boa vontade demonstrada.

- a todos os componentes do grupo
de Bioquímica das Faculdades de Filosofia e de Me-
dicina desta Universidade, pela cooperação, incen-
tivo e entusiasmo com que estimularam o autor.

- aos monitores Henrique Rigatto e
Walter Koff, e à Dra. Bazilicia C. de Souza, sem
cujo esforço não seria realizado êste trabalho.

- a todos que cooperaram na confec-
ção final destas páginas, particularmente à Dire-
ção da Livraria Selbach e ao aluno Reno D. Viero ,
pela cooperação contínua e incansável.

C A P Í T U L O I : - INTRODUÇÃO

Todo aquêles que computar, mesmo por curiosidade, os volumes mais recentes dos periódicos especializados em Bioquímica, ficará certamente surpreso e impressionado em face da variedade imensa de trabalhos de investigação que estão sendo desenvolvidos neste setor. A primeira vista, poderia parecer uma coletânea confusa, não sistemática, de informações sobre os mais variados aspectos químicos observados em seres vivos.

Entretanto, como afirma na introdução de um artigo recente, porém já clássico, o prêmio Nobel de Química, Sir Hans A. Krebs, "da enorme quantidade de dados minuciosos que foram reunidos, emerge um quadro geral revelando algumas características marcantes da organização química da matéria viva. Apesar de os processos metabólicos serem tão variados como complexos, o número de componentes básicos é relativamente reduzido" (1).

Sem dúvida "no que se refere à composição e ao metabolismo, existe um plano fundamental de natureza química, comum a todos os animais (e muito provavelmente a outros seres vivos)" (2).

"A ciência deverá procurar sempre, a partir de montanhas de fatos acumulados, as generalizações e os princípios subjacentes que irão contribuir para a compreensão verdadeira dos fenômenos, e ter valor de previsão em áreas previamente não exploradas" (3).

Mais recentemente, estão sendo cristalizados, pela investigação bioquímica insistente, algumas destas linhas gerais, rotas de processos metabólicos em seres vivos, encadeados intimamente entre si, e cuja interação e regulação, tanto na intensidade quanto na direção de seu pro-

cessamento , estão em fase de elucidação ampla e segura.

Os mecanismos de controle metabólico - marca-passos do ritmo e da direção das múltiplas vias de metabolismo - começam a ser esclarecidos e constituem hoje um dos objetivos cardinais da pesquisa bioquímica: são as reações enzimáticas chaves, com sua constante de equilíbrio reduzida e limitante, as concentrações críticas de metabólitos intermediários que condicionam a eficiência de outras reações, os hormônios que agem sobre reações enzimáticas, etc.

"É provável", de acordo com Sir H.A. Krebs, que a regulação do metabolismo opere sempre através de variações das velocidades de reação: estas são antes aceleradas ou frenadas, do que introduzidas como novas (no sistema). Um dos principais problemas na análise de regulação é, portanto, a identificação destas reações-componentes que são limitantes de velocidade" (4).

Com a preocupação de contribuir com algo , embora modesto, no sentido do esclarecimento de facetas dos princípios mais gerais envolvidos no metabolismo intermediário, o autor iniciou um projeto de investigação bioquímica sobre pirofosfatasas inorgânicas.

Nesta introdução, através dos próximos subcapítulos, procurar-se-á delinear os motivos da escolha - do presente tema de investigação e justificar sua hipótese de trabalho. Trata-se de um planejamento que necessita para a sua execução ampla, de um período prolongado de tempo. O estudo, aqui descrito, representa, assim, uma parcela enquadrada neste programa geral.

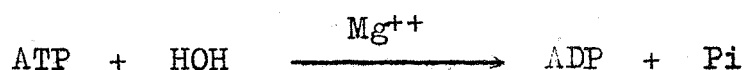
A- A origem e o papel central do pirofosfato inorgânico no metabolismo intermediário .

O organismo vivo, quasi sem interrupção, é obrigado a sintetizar moléculas mais complexas, essenciais para seu crescimento, reprodução e outras manifestações vitais. Quaisquer falhas em tais processos sintéticos não poderão ser toleradas se o indivíduo deve subsistir.

Neste conjunto estão compreendidas as macromoléculas de ácidos nucléicos (DNA e RNA), proteínas, poliosídios e lipídios, bem como uma plêiade de cofatores importantes, envolvidos em reações enzimáticas essenciais.

Estas várias biossínteses são, de maneira global, processos de caracter endoergônico - mais ou menos pronunciado. m uma ou mais fases de uma rota anabólica se impõe a participação de fontes energéticas, bioquímicas, particularmente do adenosina-trifosfato (ATP), (vide nota abaixo), ou de outros trifosfo-nucleotídios.

Frequentemente, a participação do ATP consiste em sua degradação final até adenosina-difosfato (ADP), e fosfato inorgânico, (Pi). Resumidamente:



Esta reação é acompanhada de um acréscimo de energia livre padrão (em presença do ion Mg^{++}), ao qual corresponde o valor, recentemente

NOTA - As abreviaturas se encontram relacionadas na página 126 .

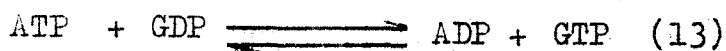
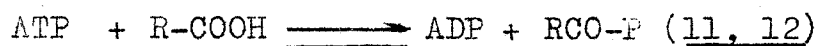
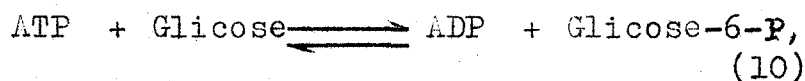
te corrigido (5, 6, 7), de

$\Delta F^{\circ} = -7,3 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ (pH = 7,0),
ou, conforme outros autores (8),

$\Delta F^{\circ} = -7,7 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ (pH = 7,5).

Tal quantidade de energia é, com frequência, suficiente para vencer as "barreiras energéticas metabólicas (metabolic energy barriers)", e permitir a realização simultânea de uma reação anabólica acoplada.

Como exemplos clássicos podemos citar os seguintes processos enzimáticos, os quais diferem entre si pela reversibilidade e pelo acceptor do fosfato inorgânico.



Entretanto, em época mais recente, verificou-se que, muitas vezes, a participação do ATP em reações enzimáticas resultava, não na clivagem da ligação pirofosfato externa deste composto, mas na hidrólise da ligação pirofosfato interna:



Já Hill e Morales (14) discutiram comparativamente estas duas modalidades de degradação, concluindo que ΔF° para a hidrólise interna do ATP em relação à hidrólise de sua ligação pirofosfato externa, deveria ser inferior em aproximadamente 1 Kcal.mol⁻¹, em valor numérico absoluto.

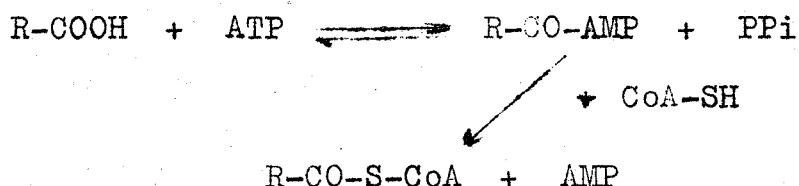
Todavia, há poucos meses, foi possível a Ratner e colaboradores provarem experimentalmente, baseados nos trabalhos de Burton (15) e Benzinger *et al.* (5), que o acréscimo de energia livre padrão da reação II é 2,6 Kcal.mol⁻¹, superior em valor absoluto, ao da reação I, em iguais condições de pH e temperatura (pH = 7,5; t = 38°C), (8).

$$\Delta F^{\circ} = -10,3 \text{ Kcal.mol}^{-1}$$

Em muitos passos metabólicos (metabolic steps), dos quais participa ATP, esta última clivagem, termodinamicamente mais eficiente, é a preferida.

Ultimamente, está sendo desvendado um número sempre crescente de reações metabólicas essenciais endoergônicas, acopladas com a degradação exoergônica de ATP até AMP e pirofosfato inorgânico. Para realçar a alta significação deste último tipo de processos metabólicos sincrônicos, pirofosfato-formadores, serão relacionados abaixo os mais importantes.

I - Metabolização de Ácidos Graxos



Hoje é aceito que estas duas reações produtoras dos chamados "ácidos ativados", precedem toda a metabolização de ácidos graxos e mesmo de outros ácidos carboxílicos.

Este processo de ativação foi primeiramente descoberto para o ácido acético (16 a 24), conduzindo historicamente à importante descoberta da coenzima A, por Lipmann. Posteriormente, a ativação de muitos ácidos graxos ficou demonstrada (25 a 29). E presentemente se admite que ela seja completamente geral, (27, 30), iniciando tanto a degradação, como a incorporação destes compostos biológicos em outras substâncias mais complexas, como os triglicerídios, as lecitinas, as cefalinas e outros lipídios.

O mecanismo geral desse tipo de reação de ativação e a maneira de participação do ATP foram demonstrados em trabalho clássico, de forma definitiva por Berg, em fins de 1956 (31 a 35).

Processo análogo foi verificado em outros compostos carboxilados. Assim, é conhecido - um sistema enzimático que ativa o ácido benzóico - (36, 37), preparando-o para a biossíntese hepática de ácido hipúrico; outro, específico para o ácido cólico (38 a 40) preparando-o para a formação dos ácidos glicocólico e taurocólico; um terceiro, para o ácido nicotínico (41) e mesmo um para a carnitina (42) um composto cujo papel biológico ainda é obscuro.

II - Metabolização de Proteínas e Amino-ácidos.

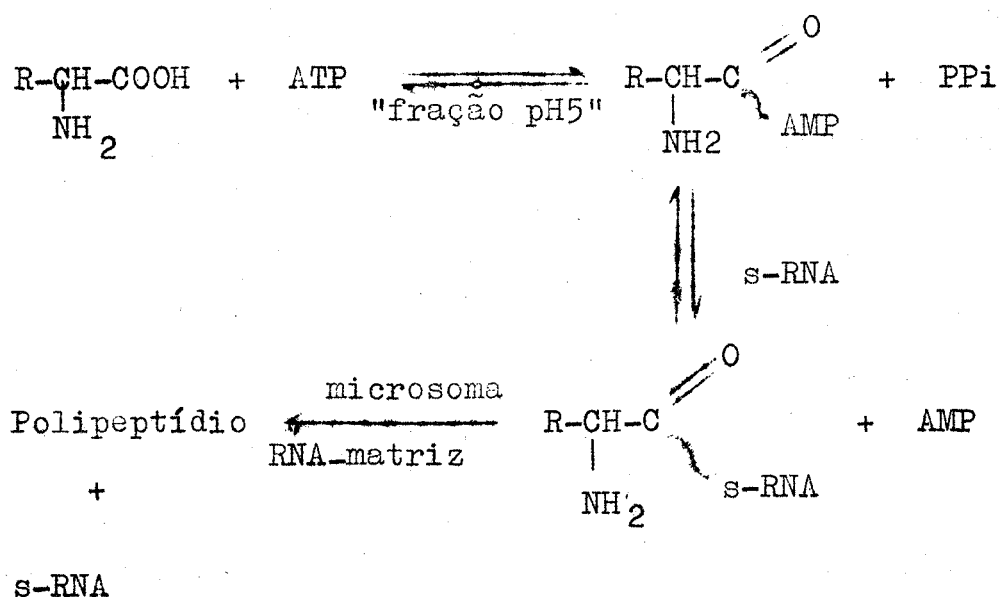
Na biossíntese de peptídios, bem como na estruturação da complexa molécula de qualquer proteína, a clivagem pirofosfato formadora do ATP é chave na condução deste processo endoergônico.

Zamecnik, Hoagland e colaboradores, do laboratório de Lipmann, conseguiram avançar um largo passo na elucidação do mecanismo enzimático de biossíntese protéica. Lograram isolar primeiramente o sistema enzimático ativador de amino-ácidos (43 a 46, 35) a chamada "fração pH5", demonstrando ainda que há enzimas específicas para vários amino-ácidos.

Posteriormente, o mesmo grupo descobriu o papel importante, específico, dos ácidos nucleicos, neste processo, caracterizando o s-RNA, (45, 47), cuja ação é essencial antes da formação de polipeptídios pelas microsomas celulares (48).

Este último aspecto, dos mais investigados nos presentes dias, apresenta uma literatura científica vasta, que espelha seu valor fundamental no metabolismo intermediário.

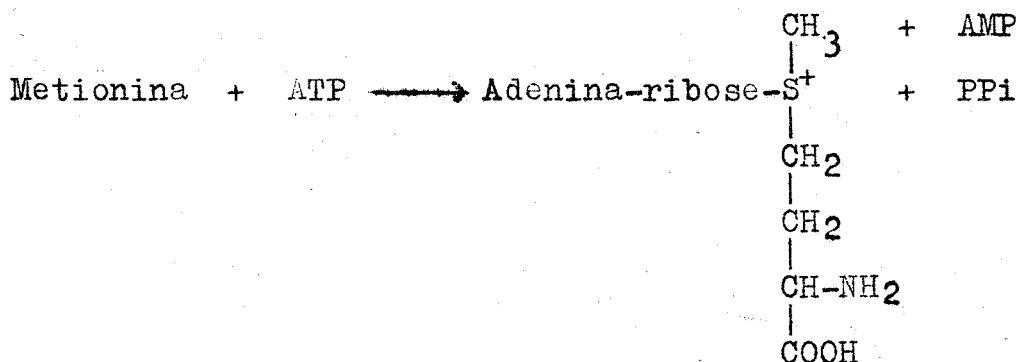
Resumidamente, pode ser esquematizada a biossíntese protéica da seguinte maneira:



Observa-se aqui, novamente, que a formação de pirofosfato inorgânico se realiza em reação francamente reversível. Como a biossíntese contida de proteínas é extremamente intensa no organismo, é fácil de imaginar a quantidade apreciável de pirofosfato inorgânico liberada no transcurso da mesma.

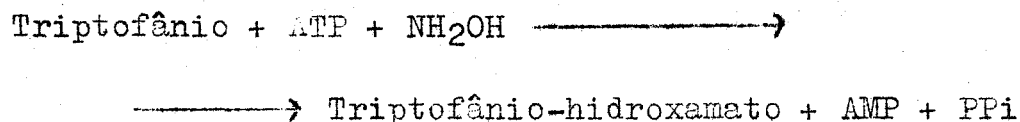
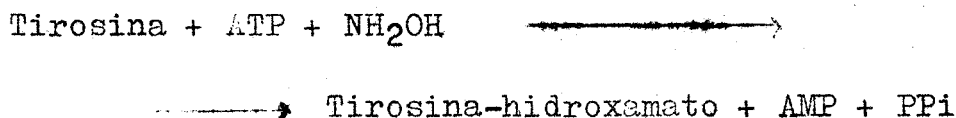
A reversibilidade da reação foi objeto de várias publicações no último ano. Assim, Schwes e colaboradores (48a) demonstraram, in vitro, que a eliminação continuada de pirofosfato, produzido na incorporação de amino-ácidos em s-RNA, era aumentada em eficiência por 20 a 30%.

Todavia, amino-ácidos são ativados, não somente para efeito de biossíntese protéica. No caso especial da metionina, a reação de ativação prossegue com um mecanismo diferente, não carboxílico, visando o organismo preparar este amino-ácido enxofrado para um processo enzimático de transmetilação (49 a 52).



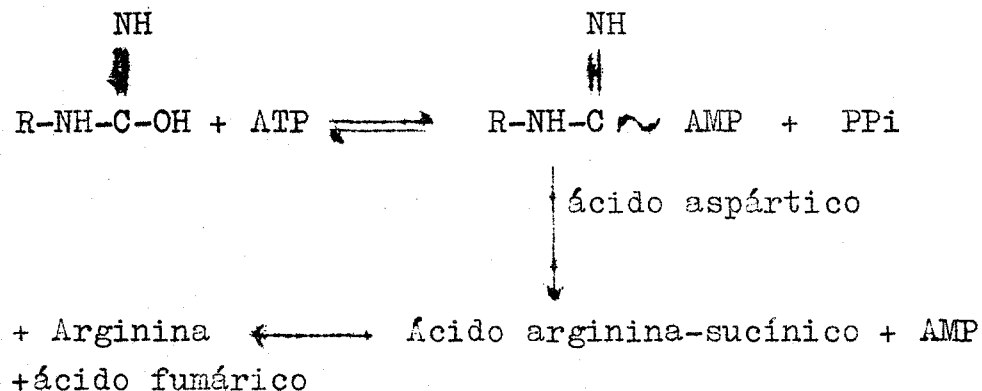
Esta é uma reação, que deve preceder a formação de uma série de metabólitos como colina, metila-histidina, anserina, adrenalina, sarcosina, betaina, etc.

Outros tipos de ativação pirofosfato formadores, porém carboxílicos, foram observados com amino-ácidos em presença de ATP e hidroxilamina. Assim, a tirosina (53) e triptofânio (54, 55) são ativados com produção de hidroxamatos, da seguinte forma:



A investigação mais ampla do ciclo de Krebs, de biossíntese da uréia (56), veio demonstrar que a transformação da citrulina em arginina, requer a presença de ácido aspártico (57 a 60). Este vai ser, na realidade, o doador direto do grupo amino, formando-se, intermediariamente, ácido arginina-

sucínico. Aqui, é essencial a presença de ATP que sofre clivagem simultânea até AMP mais pirofosfato. É proposto o seguinte esquema, com formação inicial de citrulina-AMP (61):



Bem recentemente tal reação foi objeto de estudo bastante detalhado quanto às variações de energia livre de que é acompanhada (8). Essa verificação é particularmente interessante por que permitiu estabelecer pela primeira vez, de maneira aceitável, os valores de ΔF^0 que acompanham a hidrólise da ligação pirofosfórica interna do ATP bem como a do próprio pirofosfato inorgânico, ambos de importância especial na introdução deste trabalho.

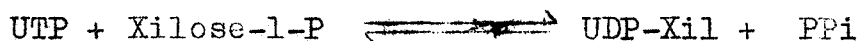
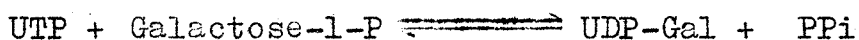
III - Metabolização dos glicídios.

Sem dúvida a contribuição recente, que mais revolucionou o conhecimento do metabolismo dos glicídios, foi a descoberta dos uridina-nucleotídios por Belcior e seus colaboradores, em Buenos Aires (62). Hoje é conhecido um grande número de transformações enzimáticas de glicídios nas quais os mesmos são "ativados" por uma combinação com nu-

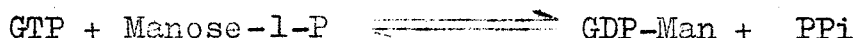
cleotídios da uridina, guanina e mesmo timidina, antes de sofrerem a sua transformação definitiva. Entre estas combinações, a reação mais fundamental é a da formação do UDPG (63 a 66), resultando paralelamente pirofosfato inorgânico:



Foram igualmente descobertas enzimas que catalisam reações semelhantes a esta com outras oses (63, 67):



ou, a base da guanosina-trifosfato, (68):



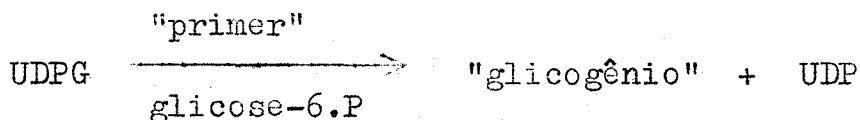
Estes nucleotídios complexos são por sua vez utilizados para a obtenção de derivados importantes. Por exemplo, UDPG é transformável em UDPGA (69), o qual depois, é o doador de ácido glicurônico em uma série de processos enzimáticos de detoxificação de fenóis, ácido nicotínico, borneol, esteróides, bilirrubina livre, etc. (70 a 73). Por outro lado, é transformável em UDP-Gal (74), UDP-Gam, UDP-Galam, os últimos presumivelmente sendo fontes essenciais de amino-oses "ativadas" na síntese de quitina, ácido condroitina-sulfúrico, ácido mucitina-sulfúrico e, de um modo geral, de

"mucopolissacarídios" complexos, substâncias constituintes do tecido colágeno, anticorpos, heparina, etc. O UDP-Gal é o intermediário metabólico na importante transformação da galactose em glicose (74).

O UDPG participa também diretamente da síntese de osídios, como a sacarose (75), sacarose-fosfato (76, 77), lactose, trehalose-fosfato (78), celulose (79), e outros osídios de origem vegetal - (80 a 83).

Porém, a síntese osídica mais importante é a que se verifica na formação de glicogênio, descoberta bem recentemente por Leloir (84 a 90).

Tal reação enzimática, de valor fundamental nos organismos animais, modificou o conceito até então tido sobre a biossíntese glicogênica através da fosforilase



É a reação preliminar, pirofosfato-formadora que, em última análise, conduz este processo anabólico, consumidor de energia.

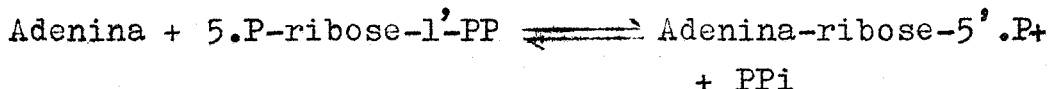
IV - Metabolização de ácidos nucléicos e nucleotídios.

Também na biossíntese do último dos quatro grandes grupos fundamentais de compostos bioquímicos, a pirofosfato-clivagem do ATP, exerce papel crucial. Isto se verifica em vários estágios.

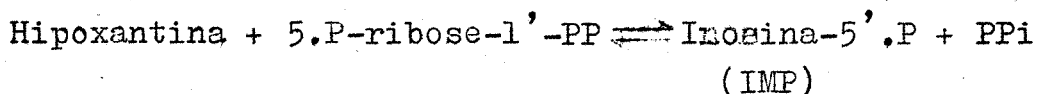
a)- Primeiramente, o ATP, através de uma fosfo-ribose-pirofosfo-quinase, fornece pirofosfato ao aceptor ribose-5.fosfato (91 a 94):



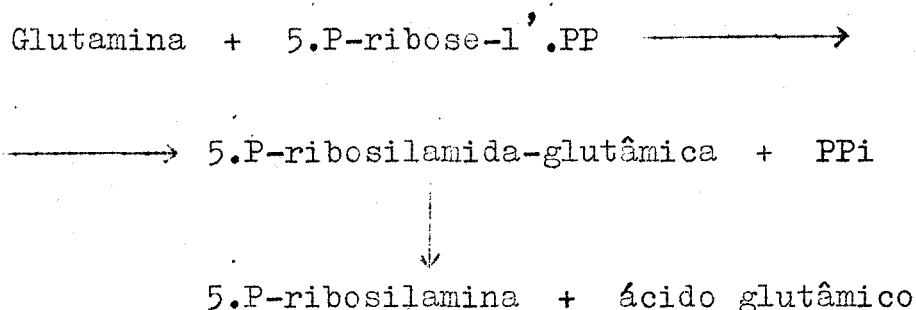
b)- Este pirofosfato orgânico pode ser utilizado pelo organismo para a formação de nucleotídios, através de várias maneiras. Assim, no chamado processo "de salvação" de biossíntese destes compostos, combina-se com bases púricas (92,94 a 96):



Fato semelhante se observou com a hipoxantina (a qual pode ser substituída por guanine ou 6-mercapto-purina), produzindo-se inosina-5'.fosfato (IMP), (94 a 96):



c)- Por outro lado, na síntese denominada "de novo", das bases púricas, e que é considerada a predominante no organismo animal, o grupo pirofosfato é substituído pelo grupo amino da glutamina, em vez da base púrica, (97 a 99):



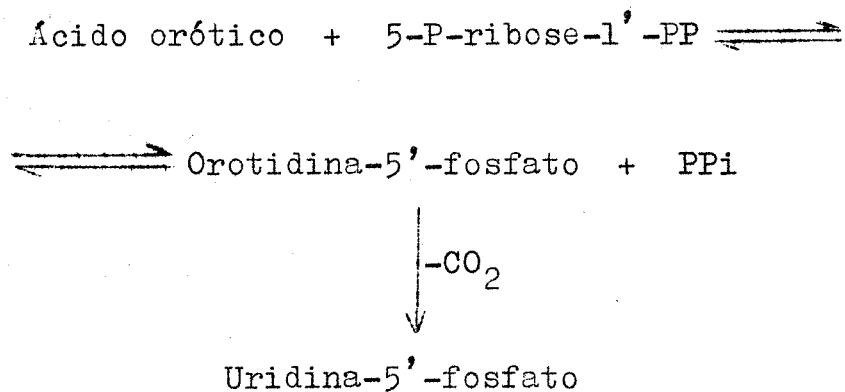
Dêste composto, o organismo parte para estruturar enzimaticamente os nucleotídios púricos, com auxílio de glicina, ácido formila-tetrahidrofólico, glutamina, CO₂-biotina, ácido aspártico e ATP, como demonstram os trabalhos de Grœnberg (100 a 103) e de Buchanan (104 a 107), e respectivos colaboradores.

Se os ribo-nucleotídios púricos são formados por esta via, o mesmo não foi possível provar para os desoxi-2-ribo-nucleotídios correspondentes. Tudo indica que êstes se originam diretamente dos ribose-compostos, análogos, previamente sintetizados.

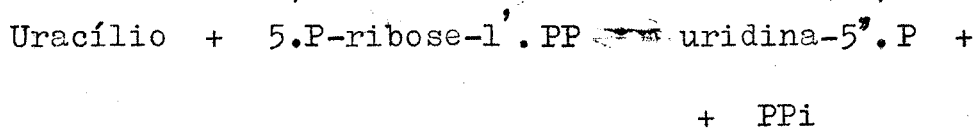
É interessante acrescentar que foram caracterizadas enzimas que realizam reações semelhantes às acima, utilizando em vez da glutamina ou adenina, substâncias imidazólicas, como o ácido imidazolacético, e a histamina, formando nucleotídios de interêsse especial (108).

d)- Quanto aos nucleotídios pirimídicos, a biossintese é feita de maneira um pouco diferente (93,95, 109). De início é estruturado enzimaticamente um composto heterocíclico, o ácido orótico. É êste que vai reagir com o 5-fosfo-ribosila-1'-piro-

fosfato, formando o orotidina-5'-fosfato, o qual, por sua vez, é descarboxilado até uridina-5' fosfato - (UMP):



Reação semelhante se observa diretamente com o uracílio, resultando uridina-5'-fosfato, além de pirofosfato inorgânico (110):

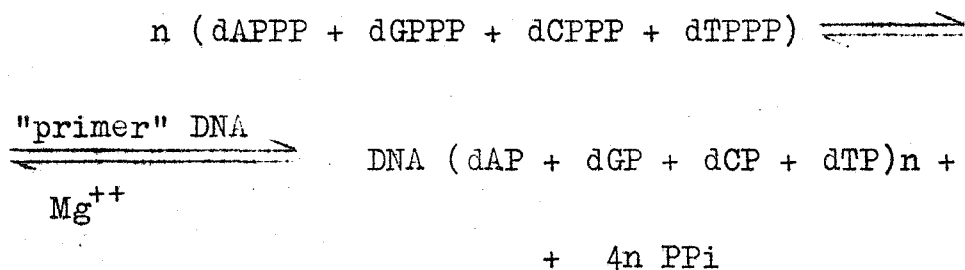


e)- Ainda, em uma derradeira fase, a reação pirofosfato-formadora é de extrema significação. Trata-se da biossíntese da cadeia polinucleotídica, ou seja, o componente final do ácido nucléico. Este sistema enzimático ocupa um lugar de singular proeminência no metabolismo intermediário, em face da extensa importância bioquímica daqueles compostos. Basta relembrar a participação essencial dos ácidos nucléicos no mecanismo de transmissão genética de caracteres hereditários, na constituição e atividade dos virus, na evo

lução de neoplasias, e, acima de tudo, na biossíntese das proteínas, tanto como elemento transferidor de amino-ácidos, bem como matriz estruturadora da cadeia polipeptídica.

No caso específico dos ácidos desoxiribo-nuclêicos (DNA), Kornberg conseguiu demonstrar a existência de um sistema enzimático, uma polinucleotídeo-piro-fosforilase, que age sobre nucleosídeo-trifosfatos (61, 111 a 114).

Os substratos podem ser os trifosfatos de desoxiadenosina (dATPP), de desoxi-guanosina, (dGPPP), de desoxi-citidina (dCTPP) e de desoxi-timidina (dTPPP), devendo estar presentes simultaneamente estes quatro nucleotídeos, além do ion Mg^{++} e de um "primer" de DNA (o qual pode ser de origem animal vegetal ou de virus) ou de polinucleotídeos sintéticos. Esquematizando:

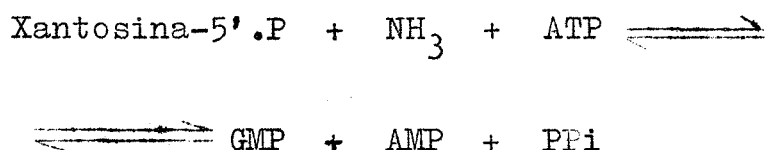


A reação é reversível e produz uma quantidade muito elevada de mols de PPi para cada mol de DNA sintetizado.

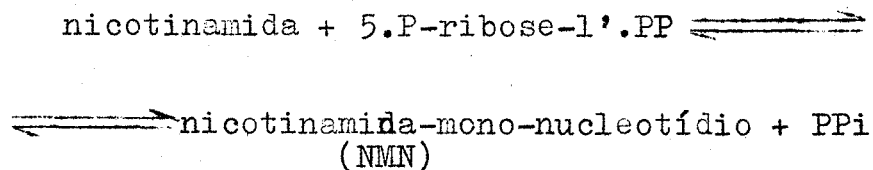
É importante chamar atenção ao facto de que a elevação da concentração de pirofosfato inorgânico no melhor de ensaio "in vitro", (até 10^{-3} M), desloca o processo nitidamente no sentido inverso.

Assim, no mecanismo de biossíntese dos DNA a concentração local de pirofosfato inorgânico pode tornar-se o fator limitante geral do sistema.

f)- Ainda neste subcapítulo deve ser citado um conjunto de reações que liberam pirofosfato inorgânico ao formar determinados nucleotídios que ocupam uma posição destacada como coenzimas. Assim, o guanosina mono-fosfato é elaborado por uma sintetase guanílica, a partir do xantosina-5' fosfato, com amônia e ATP (115):

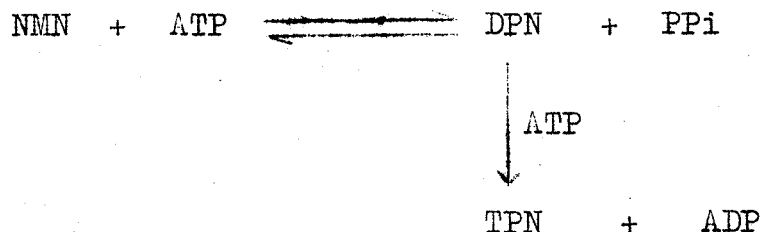


A biossíntese do nicotinamida-mono-nucleotídio (NMN) pode realizar-se a partir da nicotinamida e 5.fosfo-ribosila-1'.piro-fosfato, que, analogamente às reações das bases púricas, ou pirimídicas, liberta pirofosfato inorgânico - (116) :



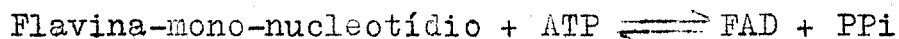
Numa segunda etapa, o mononucleotídio da vitamina B₅ é transformado, por uma pirofosforilase específica, em difosfo-piridina - nu-

cleotídio, (DPN) ou coenzima I. Esta reação descoberta por Kornberg é de extraordinária importância, em face do papel essencial que o DPN realiza durante a respiração celular (117 a 122):



Em um passo posterior, o DPN pode ser transformado em 2'fosfo-DPN, ou seja, TPN(coenzima II), de papel igualmente fundamental em vários pontos metabólicos, notadamente no ciclo das pentoses, no ciclo de Krebs dos ácidos tricarbóxicos, e na biossíntese de ácidos graxos (123 a 125).

Outro nucleotídio coenzimático, o flavina-adenina dinucleotídio (FAD) é obtido de maneira semelhante (126):

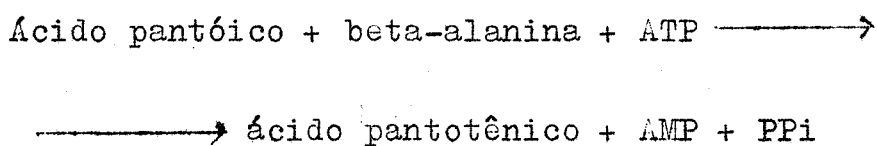


Novamente, a reação é reversível e é caracterizada pela clivagem do ATP na ligação anidridica interna de pirofosfato. O FAD, a forma metabólica mais importante da vitamina B₂, é igualmente um componente importante em enzimas respiratórias, como por exemplo, na deshidrogenase do ácido succínico, na degradação dos ácidos graxos, etc,

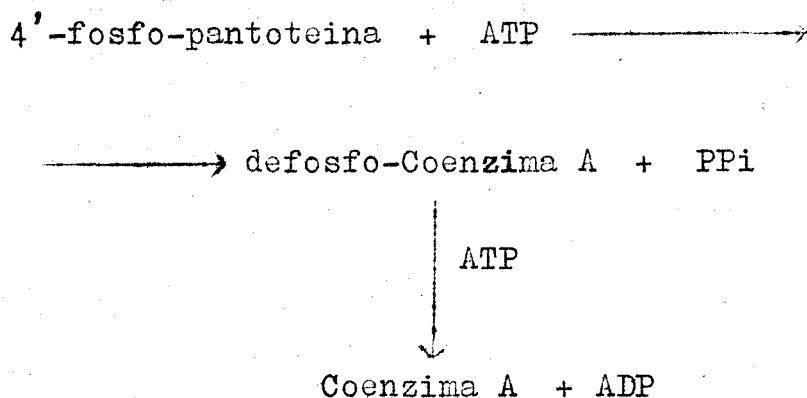
Entre os muitos nucleotídios ainda pode ser mencionada a coenzima A, um composto proveniente do ácido pantotênico e que é fundamental na

ativação inicial dos ácidos graxos e outros compostos carboxílicos.

Sua biossíntese requer a clivagem - pirofosfato-formadora do ATP; o ácido pantóico somente se condensa com a beta-alanina após ativação desta ordem (127, 128):



Além disto, em outra fase (129,130):



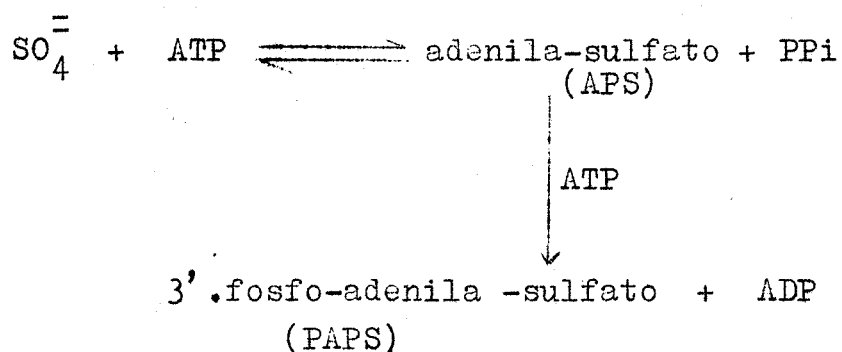
A defosfo-coenzima A em última fase, vai fornecer coenzima A, o composto biologicamente ativo (129 a 132)

V - Outros processos metabólicos.

Vimos que a clivagem pirofosfórica do trifosfato de nucleosídeo, encontra como aceptores do monofosfato de nucleosídeo, substâncias as

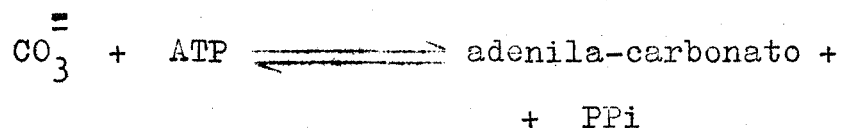
mais diversas como glicídios, ácidos carboxílicos, amino-ácidos e outros nucleotídios. Resta mencionar algumas situações semelhantes, porém especiais:

a)- A sulfatação enzimática pelas sulfoquinases, verificada na formação de inúmeros derivados (sulfatos de esteróides, sulfato de bilirrubina, sulfatos de oses e amino-oses dos "mucopolissacarídeos"), requerem a presença de "sulfato ativado". Tal se realiza pelas seguintes reações (133 a 139):



A sulfatação se verifica através do último derivado (PAPS). Reação análoga foi verificada com o selenato (140).

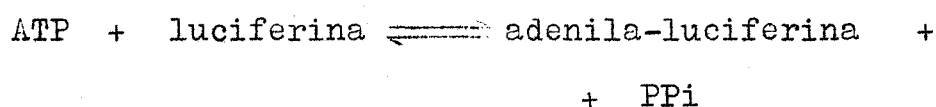
b)- Uma reação semelhante de "ativação" foi provada para o ion carbonato (17, 20):



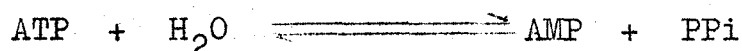
Esse tipo de "ativação" parece ser

bem mais geral e foi sugerido verificar-se com nitratos, cloretos, transporte de fragmento de um carbono independentemente do ácido tetrahidrofólico, fenolatos, etc. (61).

c)- Outro acceptor interessante é a luciferina. Com o ATP forma-se adenila-luciferina a qual emite luz quando oxidada (141, 142). Esta reação é hoje tomada como base para a dosagem mais específica, e extremamente sensível, do ATP:



d)- Pode, também, o acceptor do AMP simplesmente ser H_2O ; a enzima correspondente (encontrada no semen do touro) será então uma ATP-ase, que faz uma clivagem interna da ligação pirofosfato do ATP, produzindo AMP mais pifofosfato inorgânico (143):



e)- A formação enzimática de pirofosfato inorgânico a partir de ortofosfato inorgânico, através de uma pirofosfatase intestinal, foi comunicada várias vezes (144 a 147).

Todavia, esta reação não foi confirmada por outros laboratórios. Também é difícil conceber uma interpretação termodinâmica para a mesma.

f)- Finalmente, a clivagem do ATP pode ser de tal

ordem que o pirofosfato e não o mono-fosfonucleotí-
dio seja a parcela transferida. Há uma pirofosfoqui-
nase que transforma a tiamina em pirofosfato de tia-
mina (148 a 150). Aqui também pode ser relembrada a
reação de formação do 5-fosfo-ribosila-1'-piro-fos-
fato, mencionada acima.

B- Destino do pirofosfato inorgânico.

Como pode ser vislumbrado pelos vá-
rios itens resumidos logo acima, o pirofosfato inor-
gânico figura como produto em um grande número de
processos anabólicos, proveniente da participação -
do ATP. Foi igualmente visto, que a clivagem da li-
gação pirofosfórica interna corresponde a um acrés-
cimo de energia livre padrão bem maior do que a cli-
vagem semelhante, externa; ou seja, aquela apresen-
ta uma eficiência termodinâmica bem maior do que a
última. Esse tipo de clivagem permite, por sua vez,
a execução de um apreciável número de processos de
caracter **endoergônico**, de fundamental importância.

Deve ser destacado que:

a)- a biossíntese de glicídios mais complexos;

- b)- a ativação e degradação de ácidos graxos, bem como a biossíntese de triglicerídios e de fosfoglicerídios;
- c)- a ativação dos amino-ácidos e a biossíntese de tôdas as proteínas, portanto, também, das enzimas biocatalíticas;
- d)- a biossíntese de nucleotídios e de ácidos nucléicos; e
- e)- a formação de um variado número de cofatores enzimáticos (DPN, TPN, FAD, CoA, TPP), bem como a ativação de um grande número de metabólitos - (metionina, ions sulfato, ion carbonato, etc.), todos dependem, em uma ou mais fases, de reações nas quais se forma, simultâneamente, pirofosfato inorgânico.

A maior parte delas apresenta constante de equilíbrio aparente não muito elevada, isto é, elas são relativamente bem reversíveis em pHs em tôrno de 7,5 unidades. Desta forma, o acúmulo de pirofosfato inorgânico no sistema, durante seu prosseguimento, deveria reduzir e mesmo inverter a eficiência da reação no sentido anabólico (48a). Da mesma forma, o aumento descontrolado da concentração do pirofosfato inorgânico através de uma determinada reação iria refletir-se inibitòriamente sobre a eficiência de inúmeras outras importantes reações pirofosfato-formadoras paralelas.

Em resumo, o aumento continuado e exagerado da concentração de pirofosfato inorgânico poderia perturbar de modo amplo e quasi simultâneo um enorme número de rotas metabólicas fundamentais que desaguam no mesmo "pool". A repercussão seria um desarranjo acentuado no sincronismo harmonioso -

do metabolismo intermediário. Tal efeito se torna - ainda mais marcado, quando se considera que êstes - múltiplos componentes celulares estão em permanente equilíbrio dinâmico, ou seja, deverão ser constantemente substituídos, uns em maior outros em menor intensidade, afim de compensar o seu catabolismo, também permanente e automático.

Então, impõe-se para preservar a eficiência da biossíntese de um grande número de metabólitos de importância essencial na célula, que a concentração local ("pool") de pirofosfato inorgânico seja reduzida e conservada entre limites convenientes para a economia celular. Isto se poderia realizar por três vias gerais:

- a)- hidrólise enzimática, decompondo-o, através de pirofosfatases inorgânicas, até orto-fosfato inorgânico, de maneira praticamente irreversível.
- b)- Reutilizando-o através da inversão de uma ou outra reação pirofosfato formadora, ou através de outro processo enzimático qualquer.
- c)- Expulsando o pirofosfato, através do que se procura denominar de "compartmentization", para outros locais da célula, eliminado, assim,, um dos componentes do sistema reversível.

Enquanto que o último mecanismo não foi provado existir para o caso do pirofosfato, as duas primeiras possibilidades, certamente, devem ser consideradas.

Não é difícil conceber-se que, ao mesmo tempo em que se produz pirofosfato inorgânico,

outra reação inversa, de consumo de pirofosfato **i-norgânico** se realiza, em idêntico local celular, em face de determinada solicitação metabólica.

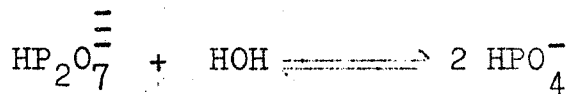
Porém, a longo alcance, é evidente que não é êste o mecanismo que permite conservar o "pool" de pirofosfato inorgânico em limites fisiológicos, ou, se isto fôr necessário, eliminá-lo completamente.

Todavia, um processo mais geral de contrôle da concentração local de pirofosfato inorgânico, parece ser atendido pela primeira das vias acima apontadas.

A hidrólise enzimática do pirofosfato inorgânico, de certa forma, em anidrido, é evidentemente um processo com acréscimo de energia livre padrão de valor negativo acentuado.

Embora a literatura registre tentativas para a determinação da constante de equilíbrio ou do acréscimo de energia livre padrão, por longo-tempo não se conhecia um valor experimental para os mesmos (151, 152).

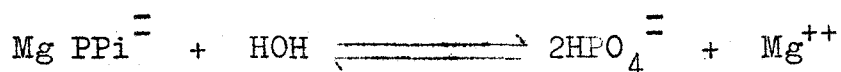
Há quem estabelecesse tentativamente em $\Delta F^{\circ} = -8,9 \text{ Kcal.mol}^{-1}$, a pH=7,5



$$\Delta F^{\circ} = -8,9 \text{ Kcal.mol}^{-1}$$

Em época recente, foi possível ao grupo de Ratner determinar êste valor com maior precisão, utilizando, para tal, a reação enzimática entre a citrulina e o ácido aspártico, produzindo ácido arginina-sucínico (8). No processo, é exigido -

ATP que termina por cindir-se em AMP mais P_i. As constantes de equilíbrio, em presença de excesso de ion Mg⁺⁺, foram determinadas em 0,89 para pH=7,0 e 8,9 para pH=7,5. Com êstes dados foi possível determinar-se o ΔF° para a hidrólise do P_i. Este valor experimental se torna bem menos negativo em presença de ions Mg⁺⁺, e corresponde a $\Delta F^{\circ} = -5,1$ Kcal. mol⁻¹ (a 37°C e pH=7,5), com excesso de ion Mg⁺⁺ (Mg⁺⁺=0,0054 M, $\mu = 0,2$). O valor calculado está bem próximo, ou seja $\Delta F^{\circ} = -4,7$ Kcal. mol⁻¹.



$$\Delta F^{\circ} = -5,1 \text{ Kcal. mol}^{-1}$$

Embora menor que o sugerido anteriormente, ainda é relativamente elevado êste valor negativo, e sublinha a importância de tal processo enzimático, que torna as reações reversíveis, acima enumeradas, de carater global fundamentalmente irreversíveis, e eficientes anabòlicamente. Cabe, nesta altura citar, do artigo de Ratner (8): "uma queda de energia de 5,1 Kcal, não deixa de ser suficientemente elevada para sustentar o ponto de vista de que a remoção do produto se verifica através de uma reação essencialmente irreversível. Cálculos de outros efeitos do ion Mg⁺⁺ mostram que a clivagem pirofosfato-formadora de ATP é associada, de per si, com várias vantagens. A diferença de 2,6 Kcal, sôbre a clivagem terminal provê um "empurrão" adicional na direção de síntese. Também um ΔF° de valor negativo elevado como o é $-10,3$ Kcal. mol⁻¹, pode permitir um número grande de reações endoergô

nicas a serem acopladas ao ATP. Assim, o ion Mg^{++} pode ter o efeito de colocar em condições eficientes, reações sintéticas que em si apresentam posição de equilíbrio bem desfavorável".

Neste sentido, pode ser elucidativo trazer outra citação de ordem mais geral, extraída do editorial recente de "DeWitt-Stetten" (3):

"Mais interessante é o princípio geral que é suportado por todos os dados aqui apresentados. O enunciado dêste princípio, embora de tonalidade confessadamente teleológico, poderá, ainda assim, apresentar mérito.

Tôdas as vêzes que o produto de uma reação é de suficiente importância ao organismo, este, de certa forma, está disposto e é capaz de inverter suficiente energia na reação, afim de assegurar que a mesma se realize com velocidade adequada e na direção conveniente".

Em trabalho anterior, em 1958 (154) o presente autor assinalou e discutiu primeiramente a extensa significação geral das reações pirofosfato-formadoras e o possível papel de marca-passo metabólico que a pirofosfatase inorgânica eventualmente pudesse apresentar. Este ponto de vista foi também exposto mais tarde (1960), (8), como referido antes.

Tendo em mente o exposto acima, não é difícil de prever, ou, pelo menos, supor que as pirofosfatases inorgânicas, devem ter distribuição ampla e ubíqua, tanto no reino animal, como no reino vegetal e em microorganismos. Devem também ser encontradas nos mais diversos tecidos, e na célula, em suas diferentes frações subcelulares. Igualmente, é possível admitir a existência de vários tipos

de pirofosfatases inorgânicas, particularmente diferenciáveis por seus pHs ótimos de ação.

Compulsando a literatura, pode ser verificado que foram provadas existir em bactérias (155, 156), leveduras (157 a 161), fungos (162, 163), plantas (159, 164 a 166) e em diversos tecidos animais: fígado (167 a 169), rins, mucosa intestinal (170), cérebro (171, 172), músculo (173), osso, baço (174), bem como no sêro (154, 175, 176), em eritrócitos (177, 178) e em plaquetas (179).

Dêstes trabalhos todos, é clássica a cristalização da pirofosfatase inorgânica da levedura por Kunitz (161, 180).

Sabe-se que em regra exigem como cofator o ion Mg^{++} que as ativa (169, 181, 182). Podem ser inibidas pelos ions F' e Ca^{++} (169, 183), devendo apresentar grupos sulfidrila livres (169, 183, a 185).

O pH ótimo é variável, podendo surgir, conforme vários autores, tanto em zonas ácidas como neutras e alcalinas (3,5 a 4,5; 6 a 7; 7 a 8 e acima de 8), (186). Quanto aos pHs ótimos intermediários (zona neutra), é sustentado que a sua distinção seria muito difícil, tratando-se realmente de uma zona só (169).

C- Objetivo d'este trabalho.

Nesta altura, é possível delinear-se o objetivo do presente trabalho.

Pelo exposto nos subcapítulos acima, foi evidenciada a rede extensa de reações enzimáticas, figurando como essenciais no mapa das rotas metabólicas fundamentais, que determinam a formação e levada de pirofosfato inorgânico.

Foi visto também o papel das pirofosfatases inorgânicas em reduzir a concentração local d'este produto, contribuindo para a maior eficiência das reações de biossíntese.

Até a presente data o conhecimento sobre estas pirofosfatases inorgânicas, particularmente as de origem animal, é bastante incompleto. Pouco ou nada é conhecido em detalhe sobre sua distribuição tecidual, localização intracelular, características cinéticas, pHs ótimos, cofatores, inibidores, etc.

Só com um conhecimento de tais dados será possível avaliar, e mesmo prever, com maior precisão e certeza, as funções específicas das diversas pirofosfatases inorgânicas em face do metabolismo intermediário. Estas informações poderão constituir contribuição de utilidade para melhor compreensão integrada do bioquimismo celular.

O autor se propôs executar um estudo sistemático, planejado, neste sentido. Pretende examinar no futuro, comparativamente, a distribuição de pirofosfatases inorgânicas nos diversos

órgãos animais, identificar os diversos representantes destas enzimas em função de seus pHs ótimos, determinar a sua localização nas várias frações subcelulares - núcleo, mitocôndria, microsomas e sobrenadante citoplasmático - conseguir a purificação, ou isolamento em cada um dos casos observados, e finalmente, estabelecer as características cinéticas destas pirofosfatases inorgânicas.

Um projeto desta natureza corresponderá a um esforço prolongado de investigação laboratorial. O presente trabalho representa a parte inicial de sua execução completa, e se concentra particularmente no exame de dois órgãos de elevada atividade metabólica, o fígado e o pâncreas, e nestes, na correspondente fração nuclear.

No próximo capítulo serão descritos o material e os principais métodos empregados neste sentido.

No seguinte capítulo serão expostos os resultados obtidos e discutida a significação dos mesmos.

C A P Í T U L O I I : M A T E R I A L E M É T O D O S

- 1)- Para objeto experimental na execução do estudo sistemático de pirofosfatases inorgânicas, foi escolhida a cobaia.
- Vários fatores foram considerados para este fim:
- a)- Trata-se de uma espécie animal já largamente explorada sob ponto de vista bioquímico, particularmente metabólico.
 - b)- Seu comportamento não se afasta marcadamente das características metabólicas gerais dos mamíferos.
 - c)- É animal acessível em nosso meio, em condições suficientemente padronizadas sob ponto de vista genético, permitindo uma resposta biológica uniforme e passível de generalização estatística.
 - d)- Por ser animal de pequeno porte e que pode ser adquirido em número satisfatório, o sacrifício continuado e necessário dos mesmos não apresenta obstáculo maior.
 - e)- A constituição anatômica da cobaia permite um acesso fácil aos órgãos visados, e a sua perfusão com solução isotônica se executa sem dificuldades acessórias. Há assim a possibilidade de estender o trabalho para um estudo comparativo das pirofosfatases inorgânicas, sem necessidade de recorrer a várias espécies de animais, simultaneamente. Isto é especialmente importante no caso do pâncreas. Este órgão se encontra

em regra sob forma difusa na maior parte dos animais de laboratório de pequeno porte (rato albino, coelho) ou é de tamanho excessivamente reduzido (camundongo). A cobaia possui um pâncreas relativamente compacto, de fácil separação, atingindo em animal adulto, o peso aproximado de duas gramas, o suficiente para o fim em vista.

As cobaias usadas foram provenientes do biotério do Instituto "Desidério Finamor", da Secretaria de Agricultura do Estado do Rio Grande do Sul. São cobaias quasi completamente albinas, de colônia com acentuado "inbreeding". O estado nutricional destes animais é excelente e sua alimentação normal é bem controlada e satisfatória.

2)- Os órgãos examinados mais de perto foram o fígado e o pâncreas. Esta preferência inicial deve-se ao fato de ambos serem tecidos de intensa atividade metabólica, comparados com os demais tecidos do organismo. Em face da exposição do tema de trabalho no capítulo de Introdução, é evidente e facilmente compreensível que êles estivessem entre os tecidos de primeira escolha a serem estudados.

3)- Obtenção de homogeneizados totais.

As cobaias foram pesadas e seu sexo identificado. Posteriormente foram sacrificadas por golpe na região posterior da cabeça, e a seguir san-gradadas através de corte profundo na região anterior do pescoço.

As seguintes operações foram executadas em câmara fria, à temperatura de $+2^{\circ}\text{C}$ a $+4^{\circ}\text{C}$. Inicialmente, foi feita incisão, em cruz no abdômen e tórax dos animais, localizados os órgãos visados e as cavidades abertas foram preenchidas com gelo picado.

A seguinte etapa, a perfusão dos órgãos "in situ", necessária para a lavagem vascular e eliminação de hemácias, foi efetuada através da aorta. Mais tarde, foi verificado ser bem mais prático canular a veia cava inferior, no caso da perfusão hepática. Neste sentido isolou-se, primeiramente o vaso, introduzindo depois no mesmo, em direção distal, uma cânula de polietileno de calibre fino, e amarrada fortemente com fio de algodão. Adaptando uma seringa de 50 ml, foram introduzidos os líquidos de per

usão, sob pressão moderada.

Na preparação de homogeneizados totais o líquido de perfusão foi sacarose 0,25 M (isotônica), (vide nota abaixo), sendo tomados em regra, 100 ml da mesma. Posteriormente, por ocasião das preparações de núcleos, a perfusão foi iniciada com uma solução de NaCl (50 ml) a 0,145 M (isotônica), seguida de sacarose (100 ml) a 0,25 M contendo CaCl_2 a 0,0018 M .

A perfusão foi executada examinando a coloração do órgão, tendo o cuidado de evitar extravasamento do líquido.

Nestas condições, o pâncreas esbranquecia completamente, enquanto que o fígado e o rim perdiam a coloração vermelha chocolate intensa. No caso deste último órgão (perfusão aórtica) frequentemente permaneciam pequenas ilhotas com manchas mais escuras. Nesta situação foi utilizada para a obtenção de homogeneizado, parte de tecido renal, das zonas mais descoloradas. Após esta etapa, foi retirado o órgão, ou fragmento do mesmo, pesado e lavado com sacarose 0,25 M fria (temperatura em torno de $+2^{\circ}\text{C}$).

A homogeneização do tecido (187) foi executada com o aparelho de Potter-Elvehjem (188), com êmbolo de Teflon, e vaso de vidro Pyrex, conservado sempre na câmara fria.

Para **acionar** o êmbolo foi usado um agitador mecânico, (marca Phywe), ligado rapidamente até velocidade máxima. Ao tecido pesado foi

N O T A: as soluções empregadas, e mencionadas no presente trabalho, encontram-se relacionadas no último item deste capítulo: Reagentes.

adicionada sacarose 0,25 M fria em proporção de 1:9 (g/ml), submetendo-se, então, à homogeneização. Para obter desintegração completa do tecido, foram necessários em torno de 10 movimentos verticais do frasco. O homogeneizado assim obtido, foi diluído, para as incubações, em proporção conveniente, em geral com diluição final de 1:500, ainda com sacarose 0,25 M, ou foi submetido diretamente a operações subsequentes para a purificação de frações subcelulares, se assim o era exigido.

A diluição de 1:500 mostrou-se indicada, pois nestas condições a presença de orto-fosfato inorgânico pre-existente no tecido se tornava quasi indosável em face do volume (0,1 ml) de homogeneizado (já diluído) usado nas incubações. Ou seja, nestas condições o orto-fosfato inorgânico tecidual não produziu um ensaio em branco muito elevado comparado com os produtos da hidrólise enzimática do pirofosfato inorgânico. Por outro lado, a diluição empregada permitiu, ainda, um nível excelente de aferição da atividade enzimática em estudo.

A diluição final exata foi aferida, em regra, pela medida da absorvância da suspensão tecidual, efetuada no fotocolorímetro (Lumetron - modelo 401-A) com filtro de 650 μ .

4)- Preparação da fração subcelular de "núcleos"

(189)

- a)- Empregando a técnica de preparação de homogeneizados, foi inicialmente executada a perfusão de órgão com NaCl 0,145 M, seguida de sacarose - 0,25 M contendo CaCl₂ 0,0018 M. A homogeneização tecidual foi feita em solução de sacarose

0,25 M. com CaCl_2 0,0018 M , em proporção de 1:9 (g/ml).

- b)- Filtrou-se o produto através de flanela, bem lavada.
- c)- 10 ml do filtrado foram colocados em tubo de centrifugação (60 ml) sobre 20 ml de uma solução mais densa de sacarose 0,34 M, com CaCl_2 a 0,00018 M. O tubo foi centrifugado a 2.000 r.p.m. durante 10 minutos. (Centrífuga Excelsa, nº 3).
- d)- Decantou-se com cuidado o sobrenadante, e o precipitado "nuclear" foi ressuspensão no próprio tubo, em 5 ml de sacarose 0,25 M com CaCl_2 0,00018 M. Com pipeta de Pasteur finamente estirada foram introduzidos abaixo desta suspensão, 10 ml de sacarose 0,34 M com CaCl_2 0,00018 M .
- e)- Seguiu-se uma nova centrifugação a 2.000 r.p.m. durante 10 minutos.
- f)- Esta operação de lavagem da fração nuclear foi repetida por mais duas vezes.
- g)- O precipitado final, branco, sem coloração que indicasse material hemático, foi ressuspensão, para emprêgo em incubações, usando sacarose - 0,25 M . Para tal, foi tomado, em regra, o volume de 5 ml por grama de tecido inicial - ou seja - houve uma diluição da fração "nuclear "

de 5 vêzes.

Inicialmente, foram usadas para a ressuspensão final, sacarose 0,25 M mais CaCl_2 0,00018 M, com o objetivo de evitar, pela presença de ions Ca^{++} , a aglutinação do material nuclear.

Em face da reduzida resposta enzimática e considerando o provável efeito inibitório do ion Ca^{++} sôbre a pirofosfatase inorgânica, o CaCl_2 foi excluído da suspensão final. Realmente, nestas condições, a ação enzimática foi bem mais acentuada.

h)- Deve chamar-se atenção a que estas operações foram tôdas executadas na câmara fria, entre + 2° e +4°C.

5)- Preparação da fração subcelular de "mitocôndrias" (189).

a)- De início, a perfusão e a homogeneização foram executadas como descrito acima. O homogeneizado representava uma diluição do material na proporção de 1:9. A solução de sacarose empregada nesta primeira fase foi 0,25 M, porém sem CaCl_2 , não mais necessário para a preparação mitocondrial e de certa forma, inconveniente pela razão apontada logo acima.

b)- Após a filtração por flanela bem lavada, 10 ml do filtrado foram colocados sôbre 10 ml de sacarose 0,34 M, em tubo de centrifugação. Submeteu-se a mistura à centrifugação de 2.000 r.p.m. durante 10 minutos, afim de separar núcleos, células

las não rompidas e restos celulares.

- c)- O sobrenadante foi transferido para outro tubo de centrifugação (de plástico Ultramid S-capacidade de 30 ml) e centrifugado na Ultracentrífuga Refrigerada (Christ - Rapid Universal), durante 10 minutos a 9.200 r.p.m. (o que equivale, à base do diagrama correspondente , a aproximadamente 5.000 G). Temperatura de +2^o a +5^o C.
- d)- O sedimento "mitocondrial", assim obtido, foi ressuspense em 5 ml de sacarose 0,25 M fria - (+2^o C), e homogeneizado rapidamente.
- e)- Esta suspensão foi transferida para um tubo de centrifugação menor (plástico Ultramid S - 10 ml), e centrifugada na ultracentrífuga refrigerada por 10 minutos a 16.000 r.p.m. (aproximadamente, 24.000 G). Temperatura de +2^o a +5^o C.
- f)- A ressuspensão e centrifugação foram repetidas nas mesmas condições, mais uma vez.
- g)- O precipitado foi diluído em 5 ml de sacarose a 0,25 M, e sua concentração foi, eventualmente, adaptada em função da absorvência, medida no fotocolorímetro, com filtro a 650^{m.µ}.

6)- Preparação das frações subcelulares de "microsomas" e "sobrenadante citoplasmático" (189).

- a)- Preparou-se o órgão e seu homogeneizado como - descrito acima. Diluiu-se o homogeneizado ain-

da na proporção de 1:9 (g/ml). As soluções de saca-rose usadas não continham CaCl_2 .

- b)- O homogeneizado assim preparado foi passado a tubos de centrifugação (plástico Ultramid S- 10 ml) e centrifugado na ultracentrífuga refrigera-da por 30 minutos a 15.000 r.p.m. (aproximada--mente 22.000 G). Temperatura de $+2^\circ$ a $+5^\circ$ C. Es-ta operação sedimentou dire~~ta~~mente a maior par-te das mitocôndrias, núcleos, células intactas, e restos celulares.
- c)- O sobrenadante foi passado para outro tubo de centrifugação semelhante ao acima, e submetido à ação da ultracentrífuga refrigerada, agora - por 120 minutos, à velocidade de 18.000 r.p.m. (aproximadamente 34.000 G). Temperatura de $+2^\circ$ a $+5^\circ$ C.
- d)- O sedimento resultante foi ressuspense em saca-rose 0,25 M, fria, a $+2^\circ$ C (a diluição convenien-te, neste caso, foi variável), e constituiu a fração "microsomial".
- e)- O sobrenadante foi denominado "sobrenadante ci-toplásmatico", após diluição final de 100 ou mais vezes (g/ml), de acôrdo com a res~~po~~sta en-zimática que se procurou alcançar.

7)- Comentários referentes à preparação de frações subcelulares.

As técnicas descritas acima foram originalmente desenvolvidas para o tecido hepático, especialmente para o caso do rato albino (189 a 192).

Estas preparações, hoje clássicas, foram estudadas e aplicadas extensamente. São relativamente homogêneas quanto às características bioquímicas. Como a centrifugação diferencial do homogeneizado não representa para o bioquímico um processo de separação de entidades citológicas, mas antes constitui mais um passo auxiliar na individualização e caracterização de enzimas celulares, a extrema precisão no isolamento exclusivo e absolutamente puro de tal ou qual organela subcelular, não constitui objetivo técnico essencial. Fica, porém a ressalva de que, quando no presente trabalho são usados os termos "fração nuclear", "fração mitocondrial", etc, não se tem em mente material citologicamente puro, porém frações celulares obtidas dentro de um regime rígido, e reproduzível, de técnica laboratorial.

No caso especial do "sobrenadante - citoplasmático" como aqui preparado, o mesmo não representa um material isento de "partículas subcelulares", o que só poderia ser obtido com uma centrifugação bem mais enérgica, através de aparelhagem até o momento fora do alcance de laboratórios locais. Da mesma forma, a "fração microsomial" não representa toda a extensão da parcela celular convencionalmente denominada de microsomas. Todavia, o sistema

de centrifugação diferencial, aqui usado, permite obter frações subcelulares com um, por assim dizer, panorama enzimático, perfeitamente bem caracterizável e reproduzível quanto às pirofosfatases inorgânicas.

Em relação às frações pancreáticas, deve ser feita uma observação adicional. O sistema de centrifugação diferencial para este tecido foi menos bem estudado do que no caso do tecido hepático. Para o camundongo o qual apresenta um pâncreas bem individualizado, mas não para a cobaia, há estudos bem sistemáticos (192a).

Como nada de informativo e aceitável foi possível ser encontrado para o pâncreas de cobaia, foi adotado o esquema geral de centrifugação fracionada, empregada para o fígado.

8)- Fracionamento de proteínas da fração "nuclear" de homogeneizado hepático de cobaia.

I- Obtenção do pó de acetona (193):

- a)- Isolaram-se os núcleos de fígado de cobaia pela técnica descrita acima, inclusive com as lavagens finais.
- b)- O preparado nuclear, obtido a partir de 20 g de fígado, foi suspenso em 20 ml de água gelada, e a suspensão foi congelada.
- c)- Homogeneizou-se bem esta mistura em aparelho de Potter-Elvehjem, após descongelar a suspensão.
- d)- Centrifugou-se a suspensão, a baixa velocidade (menos que 800 r.p.m.).

- e)- Levou-se o sobrenadante a um copo grande, medindo o seu volume, e adicionaram-se paulatinamente, agitando, 10 volumes de acetona, esfriada previamente até -10°C .
- f)- A suspensão resultante, foi centrifugada a 2.000 r.p.m., durante 10 minutos.
- g)- Decantou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuspenso em 3 volumes de acetona.
- h)- Seguiu-se nova centrifugação, nas mesmas condições.
- i)- Ressuspendeu-se mais uma vez o sedimento em 3 volumes de acetona.
- j)- Procedeu-se, então, à filtração em funil de Buechner, com 2 fôlhas de papel de filtro, usando do trompa d'água.
- l)- O precipitado fino foi lavado mais 2 vezes com acetona fria, usando 3 volumes de solvente.
- m)- O resíduo final foi secado entre papel de filtro, colocado em frasco no dessecador, sob vácuo, e guardado na câmara fria a -15°C .
- n)- Todas as operações foram executadas na câmara fria.

II- Precipitação fracionada com sulfato de amônio (194):

A precipitação fracionada foi executada sobre um extrato do pó de acetona ou diretamente sobre o homogeneizado, sempre na câmara **fria** com $+2^{\circ}$ a $+5^{\circ}\text{C}$.

Sobre o pó de acetona.

- a)- O pó de acetona foi misturado, por intermédio - de homogeneizador, com água fria (aproximadamente $+2^{\circ}\text{C}$), proporção de 20 mg para 1 ml.
 - b)- Esta suspensão foi centrifugada a 2.500 r.p.m. durante 15 minutos.
 - c)- O sobrenadante constituiu o extrato inicial.
 - d)- Extração semelhante foi feita com tampão Tris , 0,02 M, pH=7,5.
 - e)- O fracionamento foi efetuado empregando, até 60% de saturação, solução de sulfato de amônio saturado, conservada na câmara fria; e acima deste valor, com sulfato de amônio sólido, seguindo sempre o esquema de Dixon.
 - f)- Uma hora após o aumento da saturação de sulfato de amônio, a suspensão foi centrifugada a 2.500 r.p.m., durante 20 minutos.
 - g)- O precipitado foi ressuspenso em 5 ml de água fria (aproximadamente $+2^{\circ}\text{C}$), e utilizado para a dosagem de proteínas e medidas da atividade pirofosfatásica.
- Quando não se observou uma precipitação eficiente, após uma hora, o material foi conservado na câmara fria por 24 horas aproximadamente, continuando-se então o processo de fracionamento.

Sobre a fração de "núcleos".

- a)- O tecido hepático (40 g) foi homogeneizado (em 300 ml) e a fração nuclear foi preparada como descrito acima.

- b)- A diluição final foi feita em água fria, a suspensão resultante então congelada e, posteriormente, descongelada.
- c)- O fracionamento com sulfato de amônio seguiu o mesmo método que o acima descrito.
- d)- Como os precipitados parciais foram diluídos em 5 ml de água gelada, houve uma concentração a partir do peso de tecido inicial de 8 vezes.

9)- Determinação da atividade de pirofosfatases inorgânicas.

Para este fim foi utilizado de um modo geral o esquema de incubação da pirofosfatase inorgânica de leveduras (180), seguido da determinação de orto-fosfato inorgânico de acordo com Fiske-Subbarow (195).

- a)- Esta incubação foi realizada em banho-maria de temperatura constante (marca Fabbe), a 37°C, o sistema contendo em regra os seguintes componentes (vide nota abaixo) : $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (5 μ móis), MgCl_2 (10 μ móis), solução tampão de pH variável (acetato ác. acético, tris-maleato, glicina - NaOH, e citrato - ácido cítrico), e finalmente, o preparado enzimático, em volume total de 1,4 a 1,8 ml.
- b)- O tempo de incubação foi costumeiramente de 45

N O T A : Para a composição das soluções, ver a relação na página 48.

minutos.

- e)- Após este período foi pipetado na mistura, um volume idêntico de ácido tricloro-acético a 10% (TCA 10 g%).
- d)- Seguiu-se a centrifugação com o próprio tubo de incubação (tubo de hemólise) a 2.000 r.p.m. durante 10 minutos.
- e)- Do sobrenadante foram pipetados 1,5 ml, para - tubos contendo 4,5 ml de água e 1 ml de reagente de molibdato de amônio.
- f)- Finalmente adicionaram-se 0,4 ml do reagente reductor (ácido l.amino-2.naftol-4.sulfônico), (e ao mesmo tempo um outro operador adicionou o mesmo reagente ao ensaio em branco preparado como acima, do qual se excluiu, ou o pirofosfato, ou o preparado enzimático).
- g)- A leitura da absorvência foi feita após 7 minutos (cronometrados), em fotocolorímetro (Lumetron - modelo 401-A) com filtro de 650 m μ , sendo tomada como o zero da medida, a amostra em branco.
- h)- Para a medida do orto-fosfato de origem endógena e daquele proveniente da hidrólise não enzimática do pirofosfato inorgânico durante a incubação, empregou-se a mesma técnica.

A curva padrão quando necessária, foi executada, da seguinte maneira:

- a)- Pipetou-se em balão volumétrico de 100 ml, 1 ml de solução padrão de orto-fosfato, contendo 100 mg de fósforo por 100 ml (KH_2PO_4).
- b)- Completou-se o volume até 100 ml com ácido tricloro-acético (TCA) a 5 g%.

- c)- Após misturar bem, pipetaram-se desta solução , em tubos diferentes e marcados, 2 - 4 - 6 - 8 - 10 ml e completou-se, em cada caso, 10 ml, com ácido tricloro-acético a 5 g %, misturando bem.
- d)- Destas diluições foram tomados 1,5 ml em cada caso, submetendo-os, às mesmas operações descritas acima. (Paralelamente foi feito um ensaio em branco, com 1,5 ml de ácido tricloro-acético 5 g %, com o qual se ajustou a absorvência zero).
- e)- Os diversos tubos corresponderam a concentrações de amostras originais determinadas como descritas acima, respectivamente de 12, 18, 24 e 30 mg % de fósforo (P).

10- Determinação de proteínas.

Quando foi necessário determinar a concentração de proteínas, empregou-se técnica adaptada da reação do biureto (196).

- Pipetaram-se 0,5 ml ou quantidade conveniente da amostra, e diluiu-se até 2 ml com NaCl 0,145 M.
- Adicionaram-se, 5 ml do reagente de biureto, misturando bem.
- Após 10 minutos, exatos, mediu-se a absorvência - no fotocolorímetro, usando filtro de 540 m μ .
- O ensaio em branco, com o qual se calibrou o aparelho até absorvência zero, foi executado, substituindo a amostra diluída por 2 ml de NaCl 0,145M.

CURVA PADRÃO.

- A solução padrão de proteína usada (prèviamente determinada por processo micro-Kjeldahl, seguido de nesslerização), de 3,52 g %, foi diluída 10 vèzes com NaCl 0,145 M em balão volumétrico.
- Desta solução, pipetaram-se em 4 tubos, respectivamente 0,5 ml, 1 ml, 1,5 ml e 2,0 ml.
- Completou-se o volume até 2 ml com água distilada.
- Adicionaram-se 5 ml de reagente de biureto, e prosseguiu-se como acima, sendo o ensaio em branco executado também de maneira idêntica.

11- Nota final.

No transcorrer da execução do presente trabalho, algumas modificações nas técnicas gerais acima descritas, tornaram-se necessárias. Isto se verificou especialmente nas várias experiências de incubação.

Quando tal aconteceu, a alteração se encontra assinalada junto à descrição das próprias experiências.

12)- REAGENTES

Soluções tampões

1. Ácido cítrico - citrato de sódio.

$C_6H_8O_7$ (Baker p.a.) 0,1 M e

$Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ (Baker p.a.) 0,1 M

As soluções, preparadas segundo
"Methods in Enzymology", vol. I, p.
140, (197) tiveram

pH = 3,0	pH = 4,8
3,2	5,0
3,4	5,2
3,6	5,4
3,8	5,6
4,0	5,8
4,2	6,0
4,4	6,2
4,6	

2. Ácido acético - acetato de sódio.

CH_3COOH (99-100 %) (Merck p.a.) 0,2M

$CH_3COONa \cdot 3H_2O$ (Merck p.a.) 0,2 M

As soluções, preparadas segundo
"Die Methoden der Fermentforschung",
p. 787, (198) tiveram

pH = 3,6	pH = 4,8
3,8	5,0
4,0	5,2
4,2	5,4
4,4	5,6
4,6	5,8

3. Trismaleato - NaOH

Tris(hidroximetil)amino metano (Sigma 121) - ácido malêico (Pfanstiehl C.P.) 0,2 M e

NaOH (Merck p.a.) 0,2 M

As soluções, preparadas segundo "Methods in Enzymology", vol. I, p. 143, (197) tiveram

pH = 5,2	pH = 7,0
5,4	7,2
5,6	7,4
5,8	7,6
6,0	7,8
6,2	8,0
6,4	8,2
6,6	8,4
6,8	8,6

4. Glicina - NaOH

Glicina (Merck p.a.) 0,1 M e

NaOH (Merck p.a.) 0,1 N

As soluções, preparadas segundo "Die Methoden der Fermentforschung", p. 775 (198) tiveram

pH = 8,6	pH = 10,2
8,8	10,5
9,0	10,8
9,2	11,1
9,4	11,4
9,6	11,7
9,8	12,0
10,0	12,3

5. Tris - HCl

Tris(hidroximetil)amino metano (Sigma 121) 0,2 M e

HCl (Riedel p.a.) 0,2 M.

A solução, preparada segundo "Methods in Enzymology", vol. I, p. 145, (197) teve

pH = 7,5

Soluções de pirofosfato

1. 0,1 M

- Dissolver 44,61 g de pirofosfato de sódio ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$) (Analar BDH) até 1 litro com água destilada.

2. 0,01 M

- Diluir a solução anterior ao décimo.

Soluções salinas

1. Cloreto de cálcio

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Riedel p.a.) 0,1 M e 0,02 M

2. Cloreto cobaltoso

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Riedel p.a.) 0,1 M

3. Cloreto de magnésio

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Riedel p.a.) 0,1 M, 0,05 M e 0,02 M

4. Cloreto manganoso
 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Riedel p.a.) 0,1 M
5. Cloreto de níquel
 $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Riedel p.a.) 0,1 M
6. Cianeto de potássio
KCN (merck p.a.) 0,1 M
7. Fluoreto de sódio
NaF (Riedel p.a.) 0,02 M
8. Sulfato cúprico
 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Merck p.a.) 0,1 M
9. Sulfato ferroso
 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Riedel p.a.) 0,1 M
10. Sulfato de zinco
 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (IMH puro) 0,1 M
11. Cloreto de sódio
NaCl (Merck p.a.) 0,154 M

Soluções de sacarose

1. 0,25 M
- Dissolver 85,5 g de sacarose (Riedel ou Merck p.a.) até 1 litro com água destilada.
2. 0,25 M com cloreto de cálcio 0,0018 M
- Dissolver 0,2645 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck p.a.) até 1 litro de sacarose (técnica) 0,25 M

3. 0,25 M com cloreto de cálcio 0,00018 M

- Dissolver 0,02645 g de

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck p.a.) até 1 li
tro com sacarose 0,25 M

4. 0,34 M

- Dissolver 116,28 g de sacarose

(Riedel ou Merck p.a.) até 1 li-
tro com água destilada.

5. 0,34 M com cloreto de cálcio 0,00018 M

- Dissolver 0,02645 g de

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck p.a.) até 1 li
tro com sacarose 0,34 M

Solução de Versene 0,1 M

- Dissolver 0,9306 g de versene (sal
sódico do ácido etilena-diamino-
-tetracético, Titriplex) até 25ml
de água destilada.

pH = 8,0

Solução de TCA

10 g %

- Dissolver 10 g de $\text{CCl}_3\text{-COOH}$
(Merck p.a.) até 100 ml de água
destilada.

5 g %

- Diluir a anterior 2 vezes.

Solução de molibdato de amônio

- Diluir 67 ml de ácido sulfúrico
concentrado $d=1,82$) (Riedel p.a.)

ou Merck p.a.) em 450 ml de água destilada.

- Adicionar 12,5 g de molibdato de amônio $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Riedel p.a.)
- Completar o volume de 500 ml com água destilada.

Reagente Redutor

- Pesar 20 g de sulfito ácido de sódio (Merck p.a.) e juntar 1 g de sulfito de sódio anidro (Riedel p.a.).
- Dissolver o conjunto em água destilada até completar 200 ml.
- Triturar 0,5 g de ácido 1.amino-2.naftol-4.sulfônico (Merck p.a.) em gral com um pouco da solução de sulfitos. Juntar à solução e lavar o gral com a mesma.
- Deixar sedimentar e filtrar.

Solução padrão de ortofosfato

- Dissolver 4,390 g de ortofosfato biácido de potássio (KH_2PO_4) (Baker p.a.) (secado sobre cloreto de cálcio anidro por 24 horas), até 1 litro de água destilada (100 mg de fósforo ortofosfórico em 100 ml).

Reagente do Biureto

- Preparar solução de NaOH (Merck p.a.) saturada, livre de bicarbonato.
- Tomar 92 ml desta solução e adicio-

nar água destilada até completar
300 ml

- Adicionar 100 ml de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
(Merck p.a.) a 1 g %
- Misturar bem e usar rólha de bor-
racha.

Solução padrão de proteínas

- Tomar 15 ml de 1 sôro ou plasma san-
guíneo.
- Determinar com exatidão a concentra-
ção protêica pelo método micro Kjehl-
dahl.
- Pipetar 5 ml da amostra restante e
completar um volume de 100 ml, com
exatidão. Guardar na geladeira.

Solução de sulfato de amônio

- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Riedel p.a.), solução
saturada.

Solução de p-Hidróxi-mercuro-benzoato

- 87 mg de p-HMB (Sigma), em 5 ml de
tampão Glicina-NaOH, pH=8,6.

Formol (Merck p.a.) a 10 %

C A P Í T U L O I I I :

RESULTADOS EXPERIMENTAIS

E DISCUSSÃO

No Capítulo de Introdução procurou-se evidenciar por um lado, o extenso papel do pirofosfato inorgânico no cenário geral do metabolismo intermediário, e por outro lado, a função das pirofosfatases inorgânicas em face dêste composto.

A investigação destas enzimas é esparsa e bastante incompleta, excetuando os **trabalho** de Kunitz em leveduras, e o de Naganna em eritrócitos. Em mamíferos pode ser ainda acrescentado o estudo de uma "pirofosfatase neutra", obtida de fígado total, por Swanson, com pH ótimo situado entre 7,0 e 8,0.

Nada existe, porém, de conhecimento do autor, sôbre a distribuição das pirofosfatases inorgânicas em frações subcelulares, sôbre a sua caracterização enzimática comparativa, condições ótimas de atividade, inibidores, nem mesmo se sabe o número exato de representantes desta espécie de bio catalisadores. Também as informações sôbre a sua distribuição tecidual, particularmente no sentido comparativo, é extremamente incompleta, e mesmo impossível, uma vez que o número de pirofosfatases inorgânicas é na realidade desconhecido.

Os resultados que se encontram descritos abaixo referem-se a investigação destas enzi mas em tecido hepático e tecido pancreático. **Ini** cialmente foram feitas curvas de pH da atividade en

zimática com homogeneizados totais e as diversas frações subcelulares. Os resultados destes ensaios permitiram individualizar um certo número de pirofosfatases inorgânicas, em função de seu pH ótimo. Com estes dados passou-se a estudar algumas das características mais importantes das mesmas, fixando-se neste trabalho naquelas existentes no núcleo celular hepático e núcleo celular pancreático.

A. ATIVIDADES PIROFOSFATÁSICAS EM TECIDO HEPÁTICO:

1. Homogeneizado Hepático Total.

Para a averiguação inicial de eventuais variedades de pirofosfatases inorgânicas, foram executadas várias "curvas de pH" com homogeneizado total. A diluição ótima do mesmo foi fixada, após várias tentativas em 1:500 (g/ml). Foi obedecido o seguinte esquema de incubação:

	Amostra	Branco
PPi 0,01 M	0,5 ml	-
MgCl ₂ 0,1 M	0,1 ml	0,1 ml
Tampão	0,7 ml	0,1 ml
Homogeneizado	0,1 ml	0,7 ml
H ₂ O	-	0,5 ml
Volume Total	1,4 ml	1,4 ml

Temperatura: 37 °C

Tempo: 45 minutos

O ensaio em branco, permitiu deduzir da amostra, o orto-fosfato inorgânico proveniente do homogeneizado (ou preexistente no mesmo, ou liberado de fosfatos orgânicos nêle contidos). Nos ensaios dêste ítem, bem como nas demais experiências, nas quais não era essencial conhecer-se o valor absoluto de pirofosfato hidrolisado enzimaticamente, aquela pequena parcela que se decompunha por hidrólise química, em face da temperatura, tempo de incubação e pH, não era levada em consideração. Durante as primeiras incubações, tomava-se a cautela de acrescentar, para cada pH, mais um tubo correspondendo ao sistema da amostra, porém sem homogeneizado. Os resultados destas experiências demonstraram que o ortofosfato liberado pela hidrólise química do pirofosfato foi, para as quantidades usadas, praticamente constante por tôda a escala de pH testada.

Como nas curvas de pH, não é essencial conhecer a sua linha base, mas antes os picos e zonas de atividade enzimática, foi deixado de lado êste terceiro tubo de incubação, com a vantagem de permitir uma execução mais eficiente dos ensaios restantes.

Inicialmente usaram-se os seguintes tampões:

citrato-ácido cítrico,	de pH=3,0 até 6,2, com intervalos de 0,2
tris-malêico	, de pH=5,2 até 8,6, com intervalos de 0,2
glicina-NaOH	, de pH=8,6 até 10,3, com intervalos de 0,2 e 0,3 unidades.

O primeiro tampão demonstrou ser pouco indicado, pois permitia atividades enzimáticas muito inferiores às do tampão tris-malêico, com parados em pHs sobreponíveis. Por esta razão, o primeiro foi substituído pelo tampão de acetato-ácido acético, (de pH = 3,6 até 5,8 , com intervalos de 0,2 unidades), que se mostrou bem mais eficiente.

No total, foram executadas 7 curvas de pH com homogeneizado total. O gráfico 1 é a apresentação dos resultados de uma, executada nas seguintes condições:

Cobaia albina, 450 g de peso, sexo feminino. Homogeneizado com diluição final de 1:500.

Estas curvas permitiram a seguinte conclusão geral:

- Atividade pirofosfatásica praticamente ausente até o pH = 5.
- Podem ser assinaladas claramente 4 zonas de atividade:

uma de pH=6,0 até 7,4 , com um máximo de 6,6 até 7,0
uma de pH=7,4 até 8,2 , com um máximo em torno de 7,6
uma de pH=9,2 até 10,0 , com um máximo em torno de 9,6
uma de pH=10,7 até 11,3, com um máximo em torno de 11,1

Embora as diversas curvas apresentassem uma relativa constância de resultados, não foi possível estabelecer com exatidão, os limites mais exatos das zonas de atividade, e particularmente os máximos não puderam ser bem definidos. Isto se deve, provavelmente, ao fato de não ser possível preparar o material utilizado, por sua própria natureza, com completa uniformidade. Por esta razão, os dados acima enunciados, somente devem

ser tomados como aproximações. O que pode ser concluído com mais certeza, é o fato de aparecerem 4 zonas individualizadas de atividades pirofosfatásicas. Quanto à distinção entre as duas zonas, localizadas entre os pH = 6,0 até 8,2, dados acessórios serão expostos em outras experiências a serem descritas mais abaixo.

A título de experiência piloto, foram executadas algumas curvas de pH (em número de seis), com homogeneizado total de fígado de ratos albinos. Uma destas curvas constitui o gráfico 2. Apresentou, como pode ser visto, três zonas principais de atividade enzimática (o pH muito elevado não foi testado neste caso), com máximos em torno dos pHs = 6,0, 6,6 e 8,1. Os dados obtidos, particularmente tratando-se de experiências com homogeneizados totais, não permitem avaliação comparativa com os de cobaia.

2. Fração de "núcleos hepáticos".

A execução da curva de pH com núcleos hepáticos de cobaia seguiu roteiro semelhante ao descrito no item anterior. O esquema de incubação foi semelhante. A fração nuclear, que substituiu o homogeneizado, foi obtida de 1 g de fígado, e sua suspensão final tinha um volume de 5 ml, havendo então uma diluição geral de 1:5. Algumas curvas foram feitas com o conjunto completo de tampões. As últimas, uma vez constatada a ausência de atividade em pH inferior a 5, tiveram suprimidos quasi todos os tubos com tampão acetato-ácido acético. O número total de curvas executadas foi 7.

ABSORVÊNCIA x 10

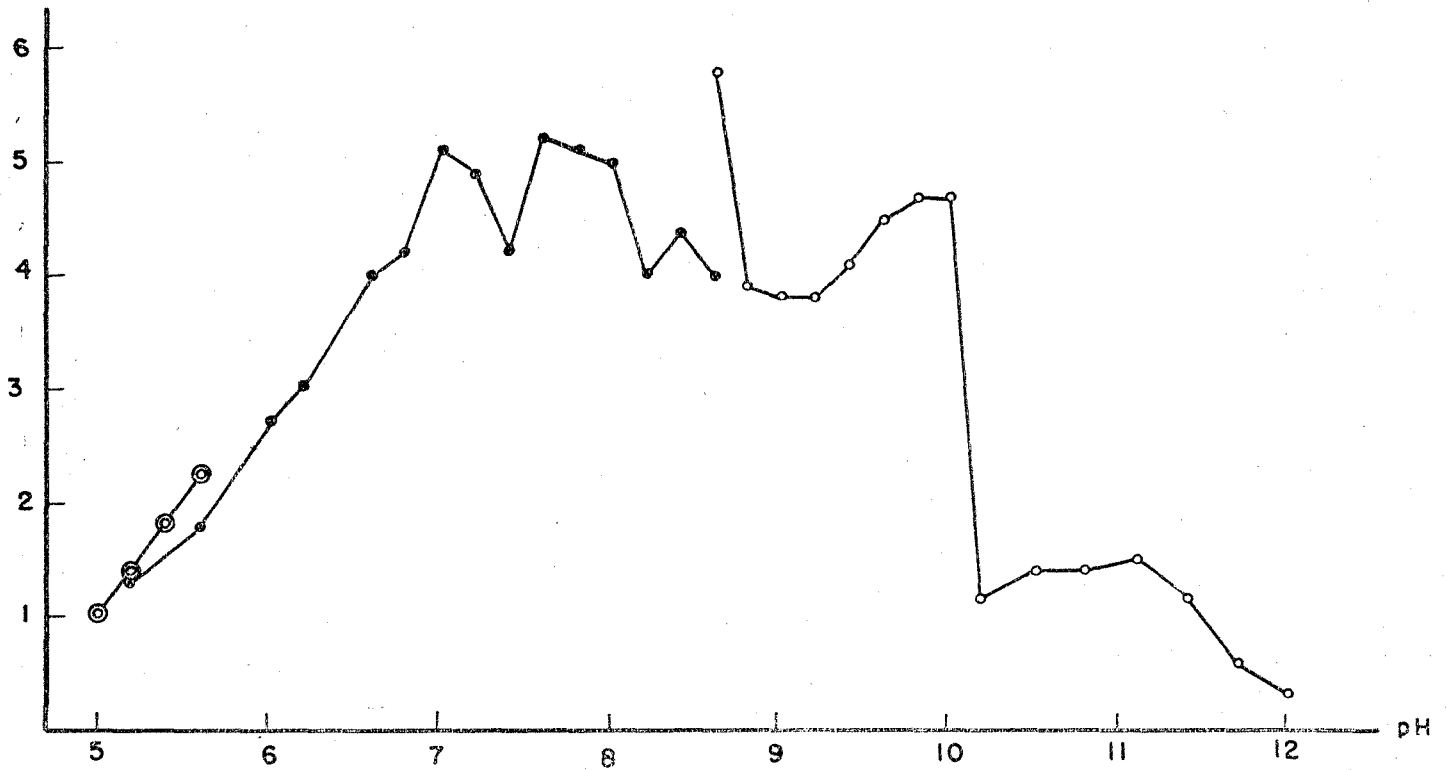


Gráfico 1: Homogeneizado total hepático — Curva de pH.

ABSORVÊNCIA x 10

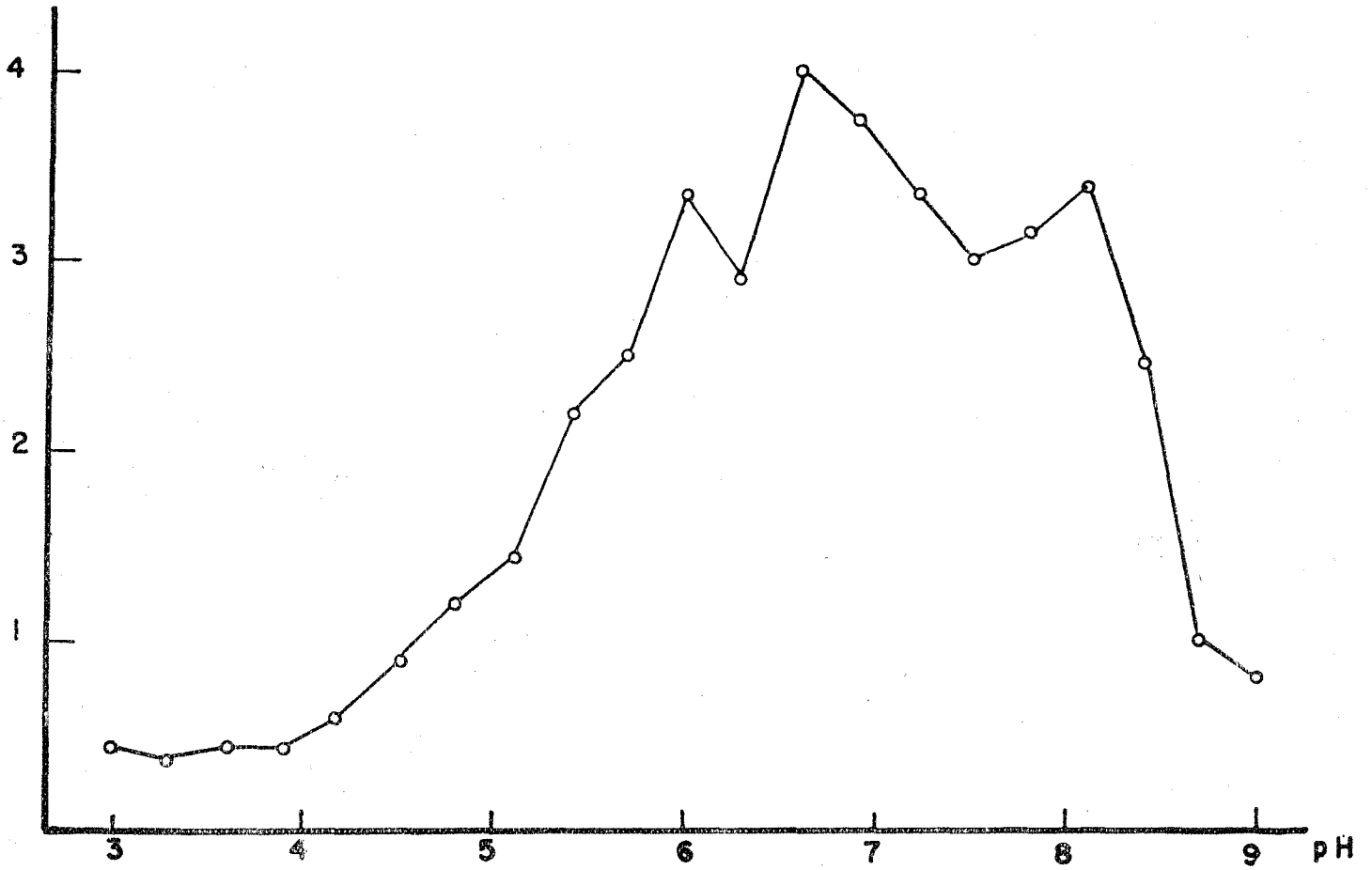


Gráfico 2: Homogeneizado total hepático (rato) — Curva de pH

O gráfico 3 representa uma destas curvas, obtidas nas seguintes condições:

Cobaia albina, 375 g de peso, sexo feminino. Perfusão pela veia cava inferior. Fração nuclear com diluição final aproximadamente de 1:5, e absorvência a 650 m μ de 0,8.

As diversas curvas obtidas, permitem as seguintes generalizações:

- Não houve zona isolada de atividade pirofosfatásica em pH inferior a 5,0.
- Três zonas gerais de atividade puderam ser individualizadas:

uma de pH=5,6 até 6,8, com máximo em torno de 6,4 a 6,6.

uma de pH=7,4 até 8,4, com máximo em torno de 7,8

uma de pH=8,6 até 11,4, com máximos prováveis em 9,6 e 11,1.

Como está ilustrado no gráfico 3, as atividades no pH alcalino foram relativamente reduzidas, embora houvesse certa constância na acentuação das mesmas nos dois pHs indicados. De qualquer forma, o estudo mais sistemático destas atividades se tornou necessário. Isto foi feito em experiências posteriores.

Quanto às atividades pirofosfatásicas em torno do pH neutro, ficou claramente evidenciado existirem duas zonas bem distintas e não uma somente, como foi proposto por Swanson (169). Esta estudou a pirofosfatase inorgânica, obtida de homogeneizado total, com pH máximo em 7,8. A de pH má

ABSORVÊNCIA x 10

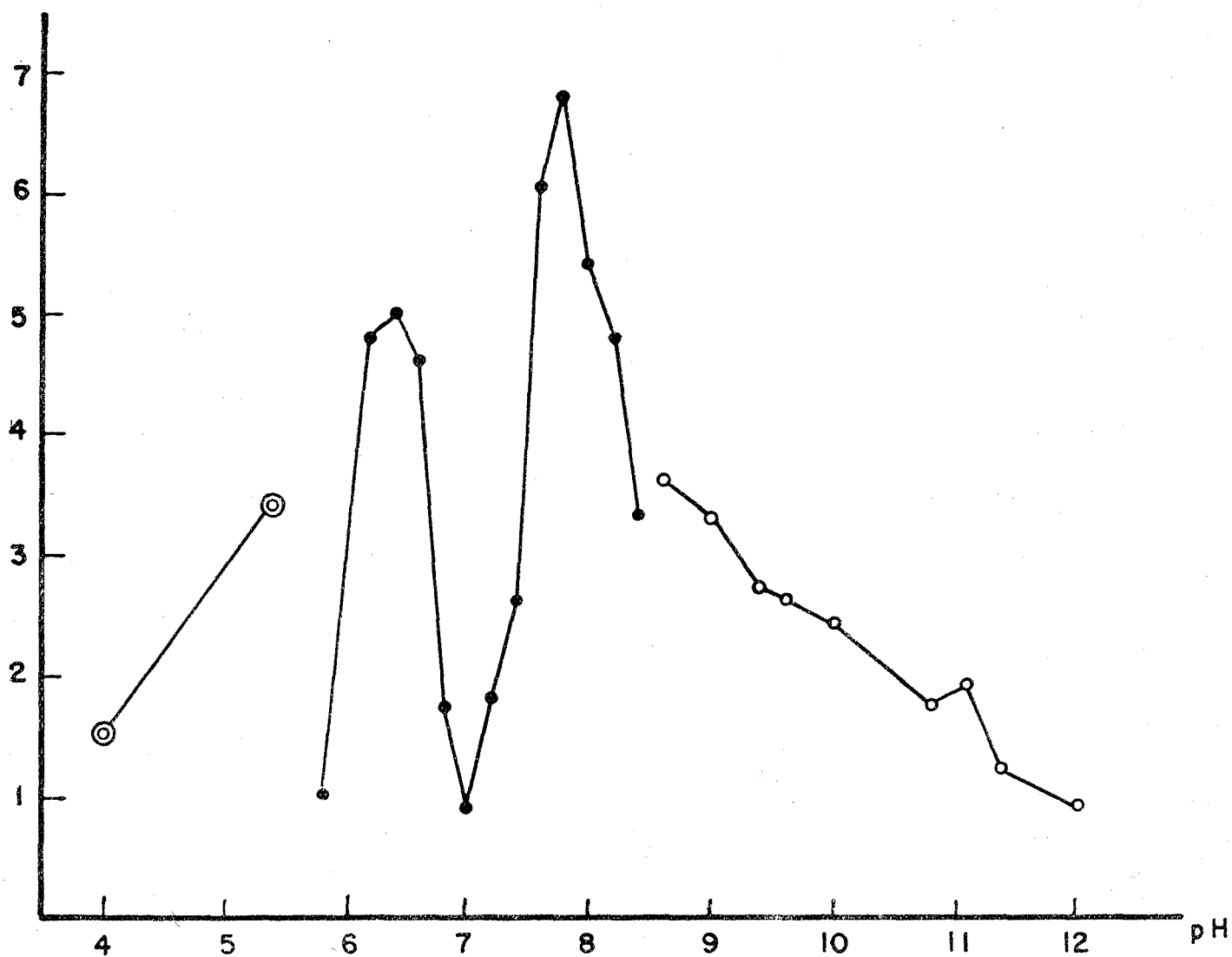


Gráfico 3: Fração de núcleos hepáticos — Curva de pH

ximo em 6,6 a 6,8 não foi descrita até a presente data. Por esta razão, constituiu preocupação especial dêste trabalho obter dados que confirmassem esta distinção, o que será descrito em outros itens mais abaixo. A dúvida principal que persistia era a de diversas atividades corresponderem a enzimas diferentes, ou a uma única enzima que pudesse apresentar dois ou mais pHs ótimos distintos. Neste sentido, deve ser chamada atenção a que a variação de pH do meio não somente exerce efeito sobre a estrutura e atividade da enzima, mas também sobre o próprio substrato. Como, no caso presente, o substrato permite uma grande variabilidade de dissociação iônica em pHs diversos, a curva de pH obtida experimentalmente muito bem poderia ser uma composição de várias curvas, não correspondentes a entidades enzimáticas diversas, mas antes representadas pelos efeitos variados da mudança do pH sobre o substrato e sobre a enzima. Esta possibilidade, embora de pouca probabilidade, sempre deve ser levada em conta em análise de curvas de pH.

Em resumo, permanece nesta altura, ainda aberta a seguinte questão: os diversos máximos de pH detectados experimentalmente correspondem cada um a enzimas individuais, ou, em um caso ou outro, foram resultantes de artefatos ocorridos durante o ensaio, e na realidade manifestações de um número menor de enzimas? A resposta para tal somente pode ser encontrada através de estudo de material enzimático purificado e pela análise do comportamento cinético da hidrólise enzimática em cada um dos pHs ótimos assinalados. A experimentação neste sentido é relatada em itens posteriores, neste Capítulo.

3. Fração de "mitocôndrias hepáticas".

Para a obtenção de curvas de pH com mitocôndrias hepáticas foi obedecido o mesmo esquema de incubação, descrito no item referente - ao homogeneizado total. A fração de "mitocôndrias hepáticas" foi preparada a partir de 1,5 g de fígado, e sua suspensão final ocupou um volume de 7ml, correspondendo então a uma diluição aproximada de 1:4,66. Após ter sido verificada ausência de atividade com os ensaios empregando o tampão acetato-ácido acético, as últimas curvas foram executadas com somente 2 valores deste tampão, para efeito de controle. O número de curvas de pH feitas foi 5.

O gráfico 4 corresponde a uma destas curvas, cujo protocolo assinala os seguintes dados:

Cobaia albino, de 470 g, sexo masculino. A diluição final da suspensão mitocondrial foi ajustada com a absorvência, medida a 650 m μ , de 1,10.

A base das várias curvas executadas, pôde ser concluído o seguinte:

- Não pode ser destacada uma zona de atividade pirofosfatásica em pH inferior a 5 unidades.
- A semelhança da fração nuclear, três zonas gerais de atividade foram evidentes:

uma de pH=6,4 até 7,2, com máximo em tórno de 6,8

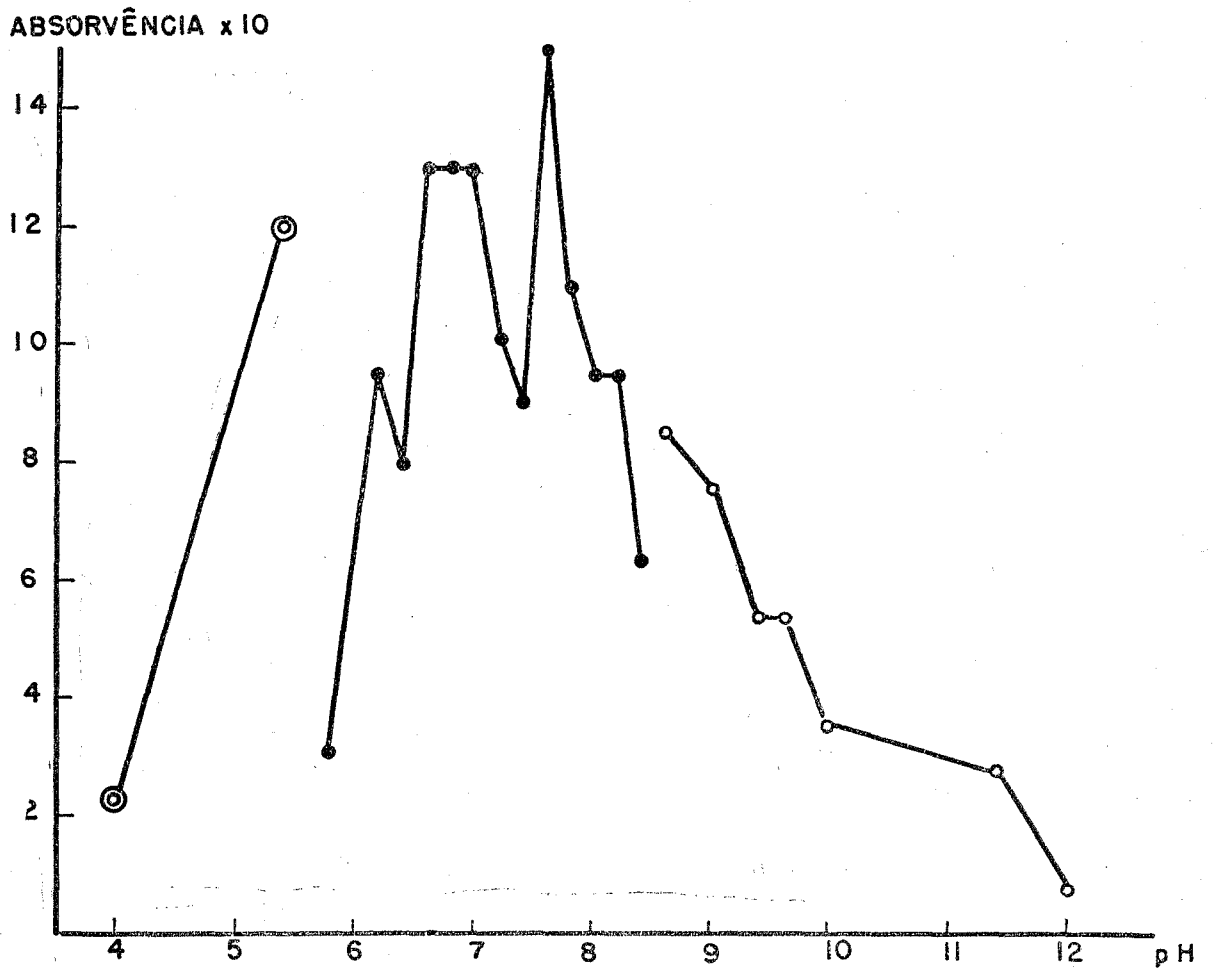


Gráfico 4: Fração de mitocôndrias hepáticas — Curva de pH

uma de pH=7,4 até 8,4 com máximo em torno de 7,8
uma de pH=8,6 até 11,4 com **inflexões** que indicam
acentuação de atividade em torno de 11,4.

Novamente a atividade em pH de valor elevado, foi relativamente fraca. A forma da curva sugere dois componentes nesta região, porém permite, como no caso da fração nuclear, supor contaminação do preparado com componentes de outras - frações sub-celulares.

Sem dúvida, porém, existe atividade pirofosfatásica pronunciada na região do pH neutro, e ficou explícito que também aqui se trata de duas zonas perfeitamente individualizáveis. As considerações expendidas no final do item anterior, também se aplicam para o caso presente.

4. Fração de "microsomas hepáticas".

Ainda nesta parte seguiu-se em linhas gerais o roteiro estabelecido para as curvas de pH do homogeneizado total. Para a preparação da fração microsomial partiu-se de 10 g de tecido hepático, cujo produto final foi ressuspense em volume de 7 ml. Houve, portanto, uma concentração de - 10:7. Pelas mesmas razões aludidas nos itens anteriores, somente dois tubos de incubação com tampão-acetato-ácido acético foram empregados, após ter sido constatada a falta de atividade em pHs muito baixos. O número de curvas foi de 6 .

O gráfico 5 descreve uma das curvas obtidas, nas seguintes condições:

Cobaia albina, de 700 g, sexo feminino.

ABSORVÊNCIA x 10

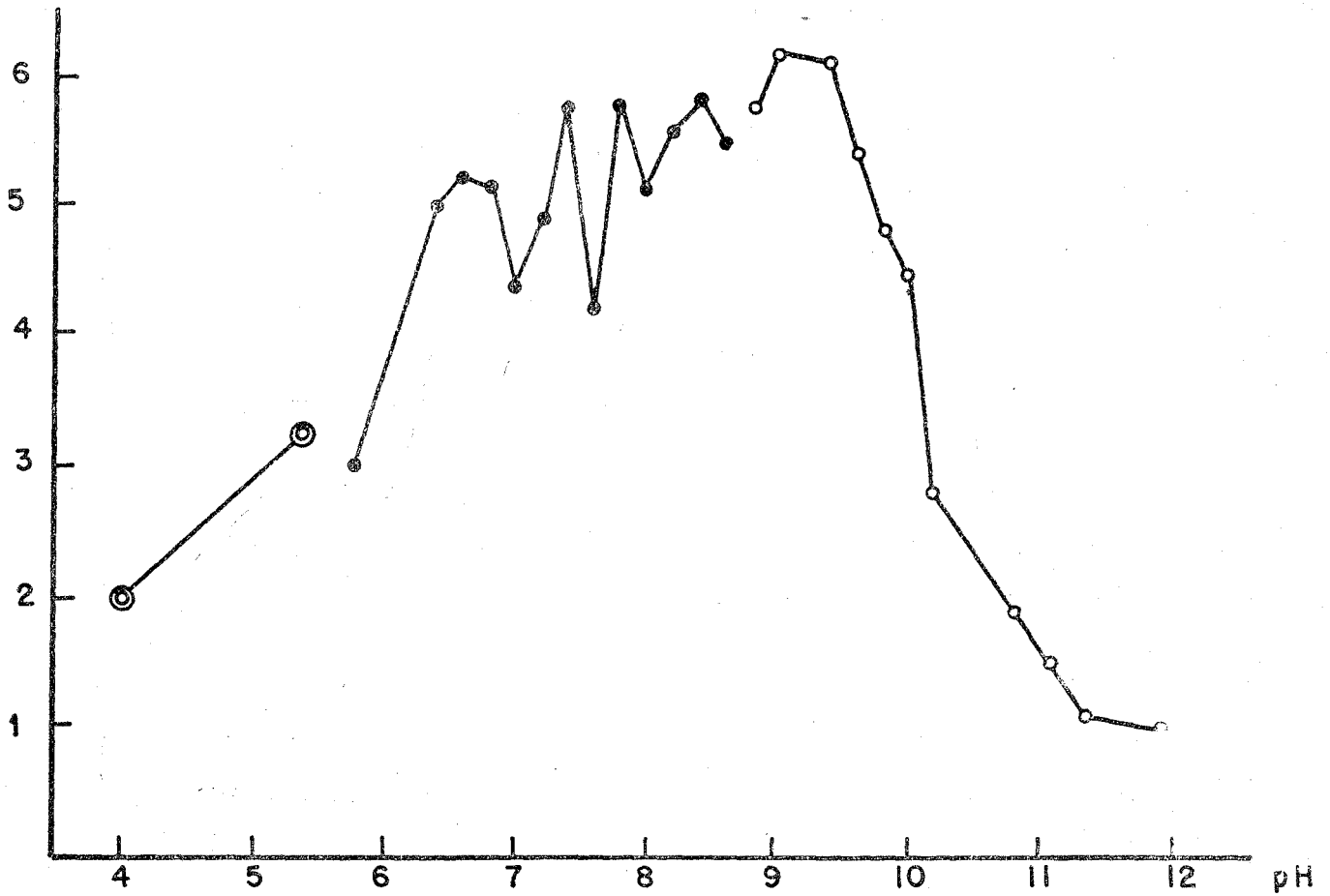


Gráfico 5: Fração de microsomas hepáticas — Curva de pH

Descobriu-se, após abatida, que esta cobaia estava grávida. Como a curva de pH correspondente não se afastasse das demais, foi conservada no conjunto. A absorvência, medida a 650 m μ , atingiu o valor de 0,15.

Desta série de experiências, foi possível observar o seguinte:

- Nenhuma atividade pirofosfatásica específica pôde ser observada em pH abaixo de 5.
- Da mesma forma, foi praticamente ausente esta atividade em torno de pH=11,0
- Duas, ou três zonas puderam ser caracterizadas:

uma de pH=6,2 até 7,6 , com um máximo em torno de 7,2 a 7,4, e outro, de localização variável, entre 6,2 e 6,8.

uma de pH=7,8 até 8,4, com um máximo em torno de 8,0
uma de pH=8,6 até 10,0 com um máximo aproximado para 9,4 .

Na fração microsomial não foi possível obter a mesma constância de resposta de atividade pirofosfatásica, como nas demais frações examinadas. Provavelmente, melhores resultados serão conseguidos através de preparações de ultracentrifugação obtidas com aparelhagem mais adequada. De qualquer forma, porém, ficou evidenciada uma ação enzimática diferenciada, em torno de pH=9,4, proporcionalmente bem mais enérgica do que a constatada nas duas frações sub-celulares anteriores. Ela costumou mesmo

ser um pouco mais elevada que as demais zonas da mesma preparação.

Quanto à distinção entre as atividades localizadas em torno da região neutra, os resultados não permitem conclusão definitiva. Tal seria possível, somente, com o estudo das características cinéticas das mesmas e eventual purificação das enzimas correspondentes.

5. Fração de "sobrenadante citoplasmático hepático"

A realização destas curvas de pH foi feita dentro da orientação anterior

Para o preparado sub-celular partiu-se de 2 gramas de tecido hepático, cuja fração de sobrenadante citoplasmático foi levada a uma diluição final que variou de 100 a 200 vezes. Quanto ao exame da atividade pirofosfatásica na região correspondente ao tampão acetato-ácido acético, foi seguido o mesmo critério que nas experiências anteriores. O número de curvas executadas foi 6.

O gráfico 6 corresponde a uma destas curvas, com sobrenadante de homogeneizado hepático obtido de cobaia albina, de 365 g de peso, sexo feminino. Diluição final de 1:140, com absorvência nula, medida a 650 m μ .

As diversas curvas permitiram chegar à seguinte conclusão:

- Não há atividade pirofosfatásica específica, nas condições aqui empregadas, em pH

ABSORVÊNCIA x 10

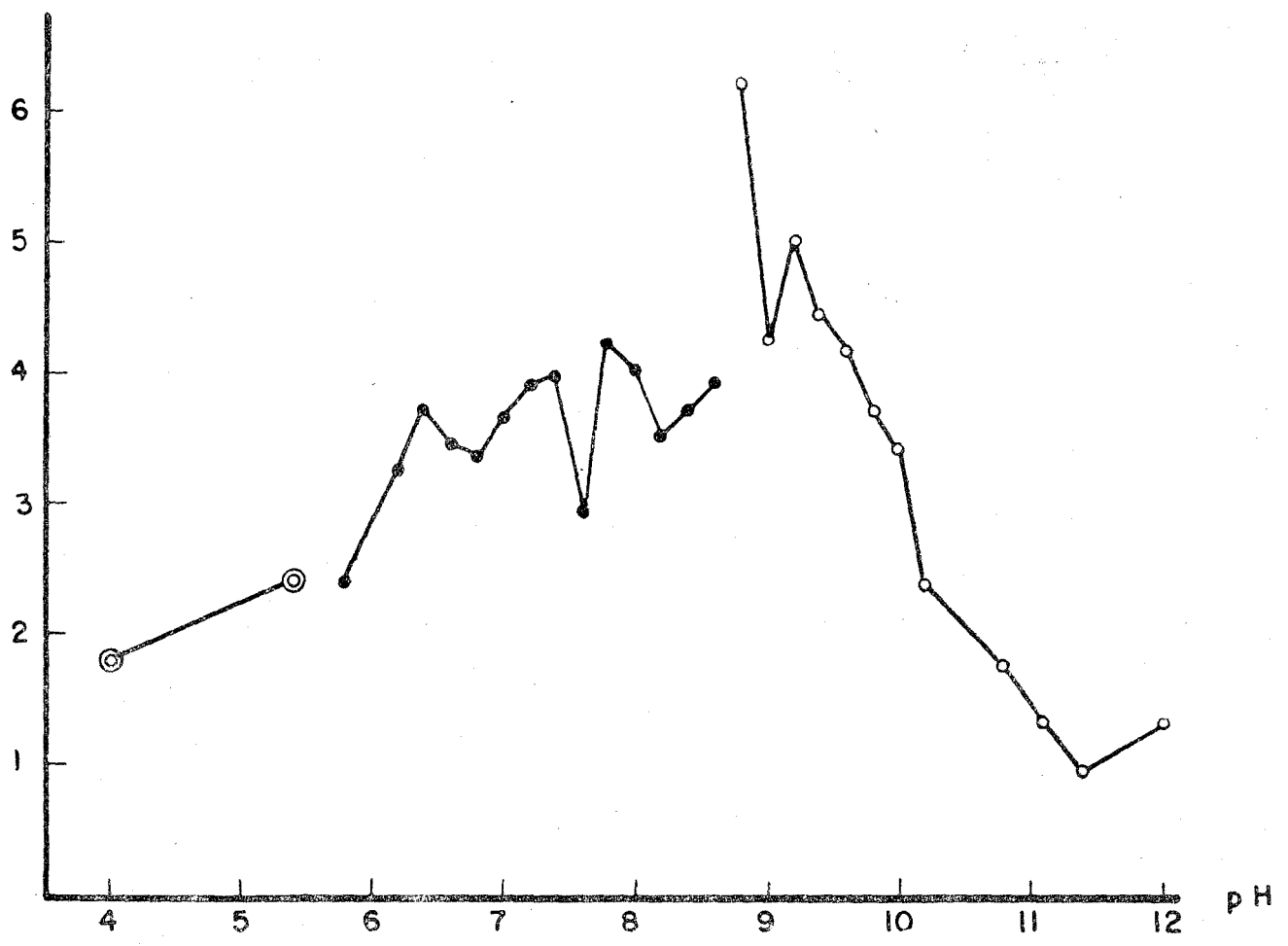


Gráfico 6: Fração sobrenadante citoplasmático de fígado — Curva de pH

inferior a 5.

- Em nenhuma das curvas pôde ser observada atividade pirofosfatásica em pH em tórno de 11.

- As atividades caracterizáveis podem ser agrupadas em três:

- uma de pH=6,2 até 7,6 , com máximo permanente em 7,4, e outro muito frequente em 6,4
- uma de pH=7,6 até 8,2 com máximo em tórno de 7,8
- uma de pH=9,0 até 10,0, com máximo em tórno de 9,2 a 9,4.

Contrário ao esperado, em face das condições de sua preparação , esta fração permitiu a obtenção de resultados muito constantes. Unicamente, o máximo em tórno do pH=6,6 não foi sempre explícito , embora a inflexão da curva nesta região o indicasse, permanentemente.

Deve ser chamada atenção a que a atividade na zona de pH=9,0 a 10,0 foi, em regra , mais enérgica do que as demais. Em referência à ação enzimática na altura da região neutra, os resultados devem ser tomados como sugestões de existência muito provável de três atividades diferentes.

6. Comentário comparativo sôbre as curvas de pH das quatro frações sub-celulares.

No gráfico 7 foram reunidos os re-

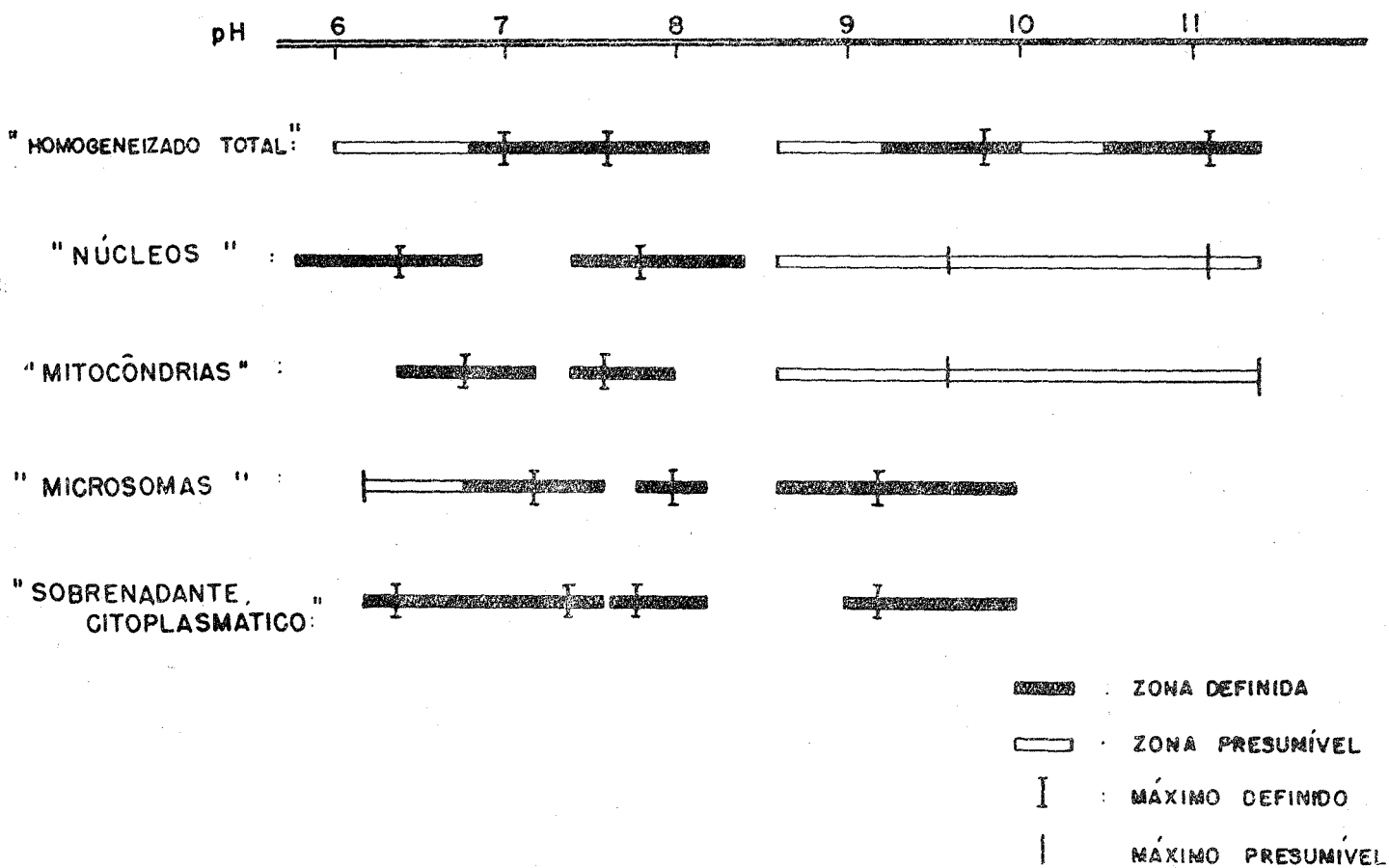


Gráfico 7: Tecido hepático — Comparação das zonas de atividade e máximos de pH

sultados mais importantes apresentados nos itens anteriores. O exame destes permite tentar algumas generalizações:

a)- Os resultados indicam que há, pelo menos quatro espécies de pirofosfatases hepáticas, em regra caracterizadas pelas seguintes zonas de atividade:

- I - entre pH=6,0 até pH=7,0 a 7,5
- II - entre pH=7,5 até pH=8,5
- III - entre pH=8,5 até pH=10,0
- IV - entre pH=10,5 até pH=11,5

b)- Os resultados obtidos com o sobrenadante citoplasmático, que não apresenta atividade pirofosfatásica na zona IV, porém quatro zonas presumíveis em pH inferior a 10,0, sugerem a existência de uma quinta espécie, pois há dois máximos entre os pH=7,0 e pH=8,0. Poder-se-ia propor então uma espécie IIa e IIb.

c)- Os pHs ótimos das espécies II, III e IV são pouco variáveis de fração para fração. O pH ótimo da espécie I, por outro lado, não parece ser constante neste sentido e permite a possibilidade de serem entidades diferentes.

d)- A atividade do tipo IV ficou restrita às frações nucleares e mitocondriais, e está praticamente ausente

nas microsomiais e no restante do citoplasma. A leve atividade encontrada poucas vezes na fração microsomial pode ser atribuída a contaminação ocasional, inevitável experimentalmente.

e)- O gráfico também ilustra o fato de que a curva de pH obtida com o homogeneizado total hepático representa a composição das curvas das frações parciais, pelo menos qualitativamente.

f)- Se a individualização das atividades pirofosfatásicas não apresenta dúvida de maior monta, o mesmo não acontece com as duas primeiras zonas. Nesta altura caberia generalizar as considerações expostas no fim do item 2 deste Capítulo. Somente o estudo do comportamento cinético destas frações bem como a sua eventual purificação, permitirão esclarecer este aspecto - mais de perto. Ensaio neste sentido, executados com a preparação nuclear, serão descritos nos próximos itens.

7. Fracionamento protéico a partir de preparação nuclear hepática.

Em vista da indagação de se os vários máximos da curva de pH da fração nuclear hepática realmente correspondem a entidades enzimáticas diferentes, ou se uma só enzima, por artefato,

poderia ocasionar a presença de dois ou mais picos diferentes, executou-se um ensaio preliminar de fracionamento de proteínas através de precipitação escalonada por sulfato de amônio. As frações assim obtidas foram, cada uma testadas quanto à sua atividade específica pirofosfatásica, nos pHs inicialmente assinalados como ótimos: 6,6 , 7,8 , 9,6 e 11,1. Se a atividade específica enzimática variasse em cada pH, diferentemente, de fração para fração, poder-se-ia concluir pela existência de pirofosfatase diferentes correspondentes a cada máximo da curva. Se as variações das atividades específicas entre dois ou mais pHs testados, fôsem semelhantes, êste dado seria uma forte sugestão de que se estaria em face da mesma entidade enzimática.

a)- Fracionamento a partir de pó de acetona de núcleo.

Foi preparado pó de acetona a partir da fração nuclear, de acôrdo com a técnica descrita no Capítulo anterior. Partiu-se de 20 g de fígado de cobaia e obteve-se 350 mg de pó sêco. Usando aproximadamente 200 mg do pó de acetona, executaram-se extrações com água e com tampão tris, pH=7,5, 0,1 M , seguindo-se o fracionamento, como descrito no Capítulo de Material e Métodos. A êstes extratos foi adicionado sulfato de amônio atingindo a saturações parciais de 20, 40, 60 e 80 %. Em cada etapa separou-se o precipitado e usou-se o sobrenadante para a seguinte adição do sal. Êstes vários sedimentos foram ressuspensos em água destilada e tiveram suas atividades pirofosfatásicas nos 4 pHs, e sua concentração protéica determinada. Como a solubili-

zação do pó de acetona não foi muito eficiente , a quantidade de proteínas recuperadas nas diversas - frações foi bastante reduzida. Desta forma, tornou se difícil determinar com segurança a atividade específica.

b)- Fracionamento a partir da fração nuclear.

Passou-se, então, a repetir o fracionamento protéico, porém diretamente sobre a fração de núcleos hepáticos, como foi descrito no Capítulo anterior. Utilizaram-se 3 cobaias albinas , (de 380, 395 e 400 g) das quais se empregaram 40 g de fígado. A preparação da fração nuclear e o seu fracionamento seguiram as técnicas descritas no Capítulo anterior. As 4 frações precipitadas à saturação de sulfato de amônio a 20, 40, 60 e 80 % foram denominados, respectivamente P-20, P-40, P-60 e P-80 . Não foi examinada fração correspondente à saturação completa, pois a quantidade de material obtida foi praticamente nula. Estas frações foram ressuspensas em 5 ml de água, cada uma, e suas atividades pirofosfatásicas nos 4 pHs, e sua concentração protéica determinadas de acordo com as técnicas já descritas. À base dos resultados obtidos, foram calculadas as atividades pirofosfatásicas específicas. Cada unidade desta corresponde a um μ mol de pirofosfato inorgânico decomposto por 1 mg de proteína em 60 minutos, nas condições de incubação descritas anteriormente.

Os resultados, expressos nestas unidades, podem ser tabulados da seguinte maneira:

pH ensaiado: 6,6 7,8 9,6 11,1

Frações

P-20	0,049	0,040	0,057	0,055
P-40	0,80	0,80	0,94	0,91
P-60	0,68	1,16	0,90	0,71
P-80	0,11	0,19	0,16	0,11

Pelos resultados obtidos, pode ser verificado que as atividades pirofosfatásicas se concentraram nas frações P-40 e P-60. Se fôr comparada a variação de atividade específica da fração P-40 para a fração P-60, pode notar-se que no pH=6,6 foi de 85 % , no pH=7,8 de 145 % , no pH=9,6 de 96 % e no pH=11,1 de 78 % . Estes dados claramente sugerem a existência de 4 pirofosfatases inorgânicas diferentes, distinguindo particularmente bem as duas primeiras. Evidentemente esta informação não basta para responder de maneira final à pergunta inicial formulada no item 2. deste Capítulo. Mesmo assim não deixa de ser um argumento sério contra a afirmativa de a atividade pirofosfatásica em torno do pH=7,0 ser causada por uma enzima só.

Em segundo lugar, esta experiência permite orientar uma futura tentativa de purificação mais apurada das diversas pirofosfatases inorgânicas nucleares do fígado. Como não era objetivo direto deste trabalho, este aspecto não foi desenvolvido no mesmo.

O exame dos dados acima, leva ainda a uma terceira consideração interessante. Se na fração nuclear ressuspensa em sacarose isotônica as atividades pirofosfatásicas nos pHs=9,6 e 11,1 foi proporcionalmente muito reduzida, em comparação às outras duas, durante a extração e fracionamento de proteínas houve uma acentuação relativa das mesmas bastante pronunciada. Isto nos deve levar a ter cautela na interpretação, especialmente sob ponto de vista quantitativo, dos resultados obtidos diretamente de frações sub-celulares com preparados pela técnica aqui adotada.

8. Estudo da fração de "núcleos hepáticos".

a)- Efeito da variação de concentração do substrato.

O preparado de fração nuclear foi obtido de cobaio albino, de 505 g de peso, sexo masculino. Os ensaios foram executados nos pHs = 6,6, 7,8 , 9,6 e 11,1 . O esquema de incubação adotado foi o seguinte(em ml):

TUBOS	0	1	2	3	4	5	6	7
Tampão	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
MgCl ₂ 0,1M	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Ppi 0,01 M	-	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	-	-
Ppi 0,1 M	-	-	-	-	-	-	0,1	0,5
H ₂ O	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	-	0,4	-
Núcleo	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
VOL. TOTAL	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4

Foi feito um ensaio em branco para cada tubo, no qual se omitiu o núcleo, substituído por igual volume d'água. Este ensaio compensava o pirofosfato liberado por hidrólise química, particularmente em face da variação de concentração do substrato. O tubo zero permitia avaliar o orto-fosfato (aqui denominado "endógeno") proveniente de material do próprio preparado nuclear. O seu valor, obtido em cada um dos pHs ensaiados, foi deduzido dos resultados obtidos nos demais tubos da série. Desta forma se obtinha um valor real de orto-fosfato liberado pela ação da pirofosfatase inorgânica.

Os resultados destas séries se encontram representados no gráfico 8. A resposta muito reduzida no pH=11,1 não permite análise desta série, porém nas outras três, pode ser observado o efeito da variação de concentração de pirofosfato sobre a atividade enzimática.

Após atingir um máximo (tubo 5 : $PP = 3,57 \times 10^{-3}$ M), já à concentração de $7,11 \times 10^{-3}$ M (tubo 6) se pode notar uma inibição acentuada pelo substrato nas duas primeiras séries. Para examinar mais de perto a extensão deste efeito inibitório, foi feito um conjunto de incubações que constituirão o objeto do seguinte sub-ítem.

Os dados presentes permitem fazer um cálculo provisório da constante de Michaelis - das três primeiras pirofosfatasas. Certamente a determinação com preparações individuais mais puras darão constantes mais precisas. Mas, mesmo assim, os resultados calculados e determinados graficamente nos poderão dar uma noção quanto à concentração de substrato correspondente à metade da velocidade da ação enzimática.

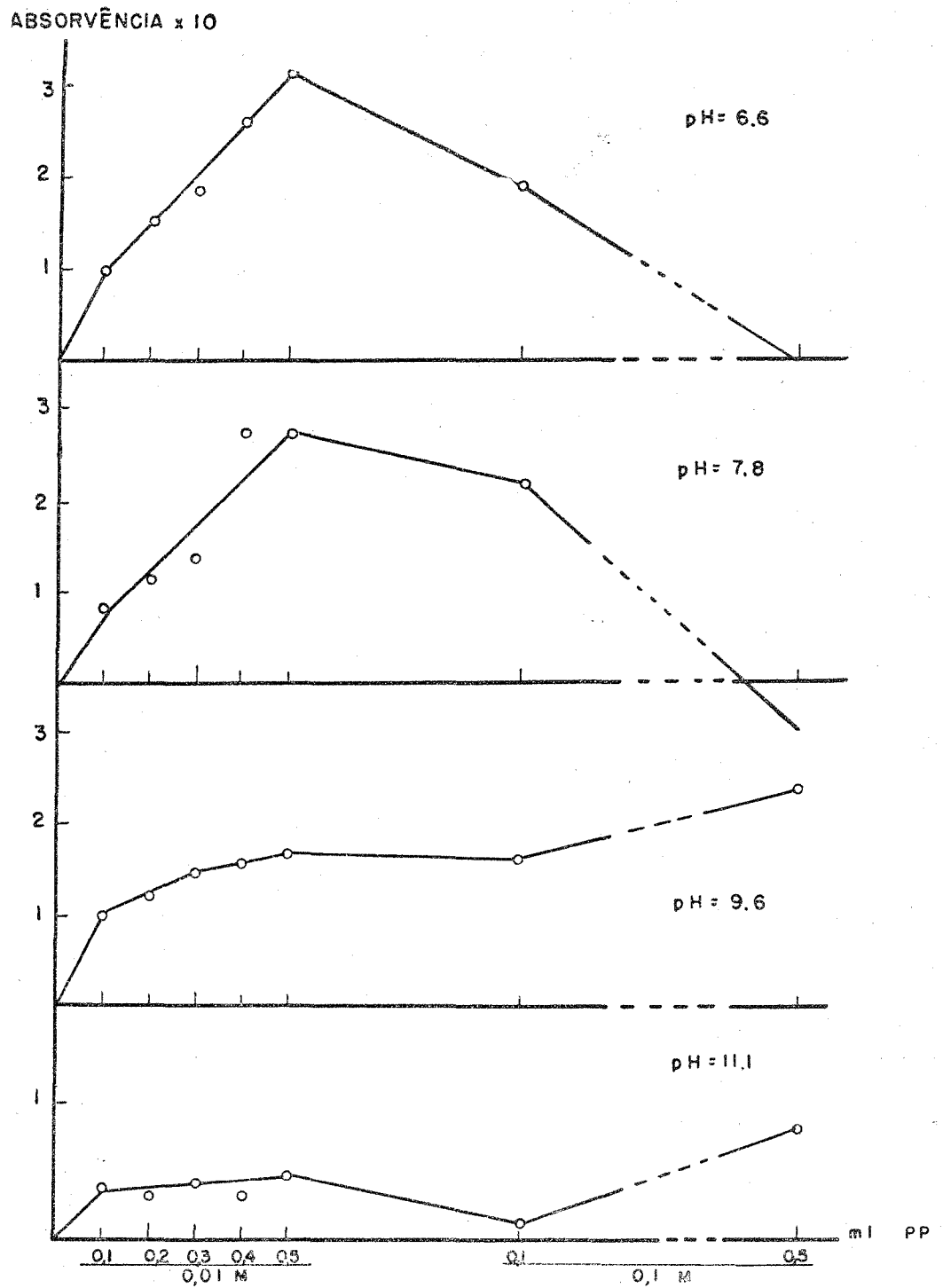


Gráfico 8: Fração de núcleos hepáticos —
— Efeito da variação de concentração de substrato.

A determinação gráfica, à base de um diagrama de reciprocidade dupla conforme Lineweaver-Burk, se encontra desenvolvida no gráfico 9.

Os resultados foram os seguintes:

pH ensaiado	6,6	7,8	9,6
1/absorvência máxima-(1/V) -	0,22	0,36	0,53
Absorvência máxima (V) nas condições experimen- tais	4,54	2,77	1,88
1/Km.10 ³ (em M ⁻¹)	0,37	0,55	1,6
Km (em 10 ⁻³ M)	2,70	1,81	0,62

Calculando as constantes de Michaelis, sem auxílio gráfico, chega-se naturalmente, a resultados semelhantes (vide Tabela à pag.75).

Estes resultados, não obtidos com enzimas purificadas, necessariamente não são muito exatos e definitivos, porém permitem ver que o Km da pirofosfatase tipo I está em torno de $3 \cdot 10^{-3}$ M, o da pirofosfatase tipo II em torno de $2 \cdot 10^{-3}$ M e o da pirofosfatase do tipo III aproximadamente em $0,6 \cdot 10^{-3}$ M. Estes resultados demonstram claramente a não identidade destas três enzimas. Por outro lado, os seus Km estão localizados no nível de concentrações correspondentes às enzimas hidrolíticas de um modo geral, ou seja, de ordem de 10^{-3} M.

b)- Efeito inibitório de excesso de substrato.

Como indicado pela série de en-

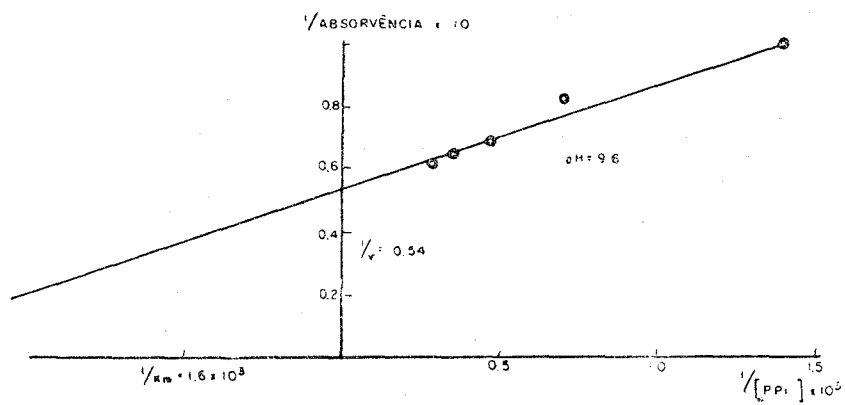
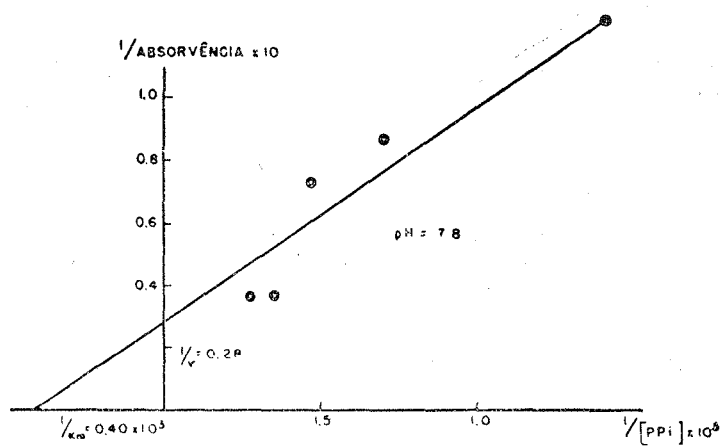
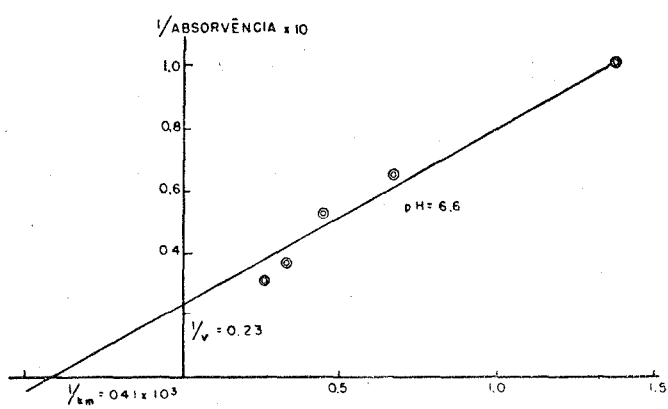


Gráfico 9: Fração de núcleos hepáticos — Determinação gráfica de K_m .

pH = 6,6				
$[PPi] \cdot 10^{-3} M$	$1/[PPi] \cdot 10^3$	Abs.10	$1/Abs.10$	Km
0,71	1,40	0,95	1,05	
1,42	0,70	1,50	0,66	$2,06 \cdot 10^{-3} M$
2,13	0,47	1,85	0,54	$1,95 \cdot 10^{-3} M$
2,84	0,35	2,60	0,38	$4,08 \cdot 10^{-3} M$
3,57	0,28	3,10	0,32	$4,75 \cdot 10^{-3} M$
pH = 7,8				$Km = 3,20 \cdot 10^{-3} M$
0,71	1,40	0,80	1,25	
1,42	0,70	1,15	0,87	$1,11 \cdot 10^{-3} M$
2,13	0,47	1,35	0,74	$1,13 \cdot 10^{-3} M$
2,84	0,35	2,70	0,37	---
3,57	0,28	2,70	0,37	$5,23 \cdot 10^{-3} M$
pH = 9,6				$Km = 2,49 \cdot 10^{-3} M$
0,71	1,40	1,0	1,00	
1,42	0,70	1,2	0,83	$0,37 \cdot 10^{-3} M$
2,73	0,47	1,45	0,69	$0,62 \cdot 10^{-3} M$
2,84	0,35	1,53	0,65	$0,63 \cdot 10^{-3} M$
3,57	0,28	1,63	0,61	$0,62 \cdot 10^{-3} M$
				$Km = 0,62 \cdot 10^{-3} M$

saíes, concentrações elevadas de pirofosfato inorgânico podem inibir a atividade enzimática. Para examinar mais de perto detalhes desta inibição, foram feitas incubações para os 4 pHs em foco, de fração nuclear hepática (cobaia albina, sexo feminino, peso de 455 g), à base da seguinte sistematização:

Esquema semelhante ao item anterior somente substituindo o pirofosfato

<u>TUBOS</u>	0	1	2	3	4	5
PPi 0,02 M (ml)	-	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3
PPi 0,1 M (ml)	-	-	-	-	-	-
<u>TUBOS</u>		6	7	8	9	10
PPi 0,02 M (ml)		0,35	0,4	0,45	0,5	-
PPi 0,1 M (ml)		-	-	-	-	0,2
<u>TUBOS</u>			11	12	13	
PPi 0,02 M (ml)			-	-	-	
PPi 0,1 M (ml)			0,3	0,4	0,5	

Foi tomada a mesma precaução, discutida no sub-ítem acima, quanto ao ensaio em branco, e ao orto-fosfato "endógeno".

O gráfico 10 corresponde aos resultados obtidos nas quatro séries. Resumindo, pode ser assinalado o seguinte:

pH	6,6	7,8	9,6	11,1
Atividade máxima (em 10^{-3} M)	4,3	2,8	2,8	2,8
Inibição máxima (em 10^{-3} M)	14,2	14,2	35,7	5,0
Grau de Inibição	72 %	100 %	79 %	-

Vários comentários podem ser feitos sobre estes resultados.

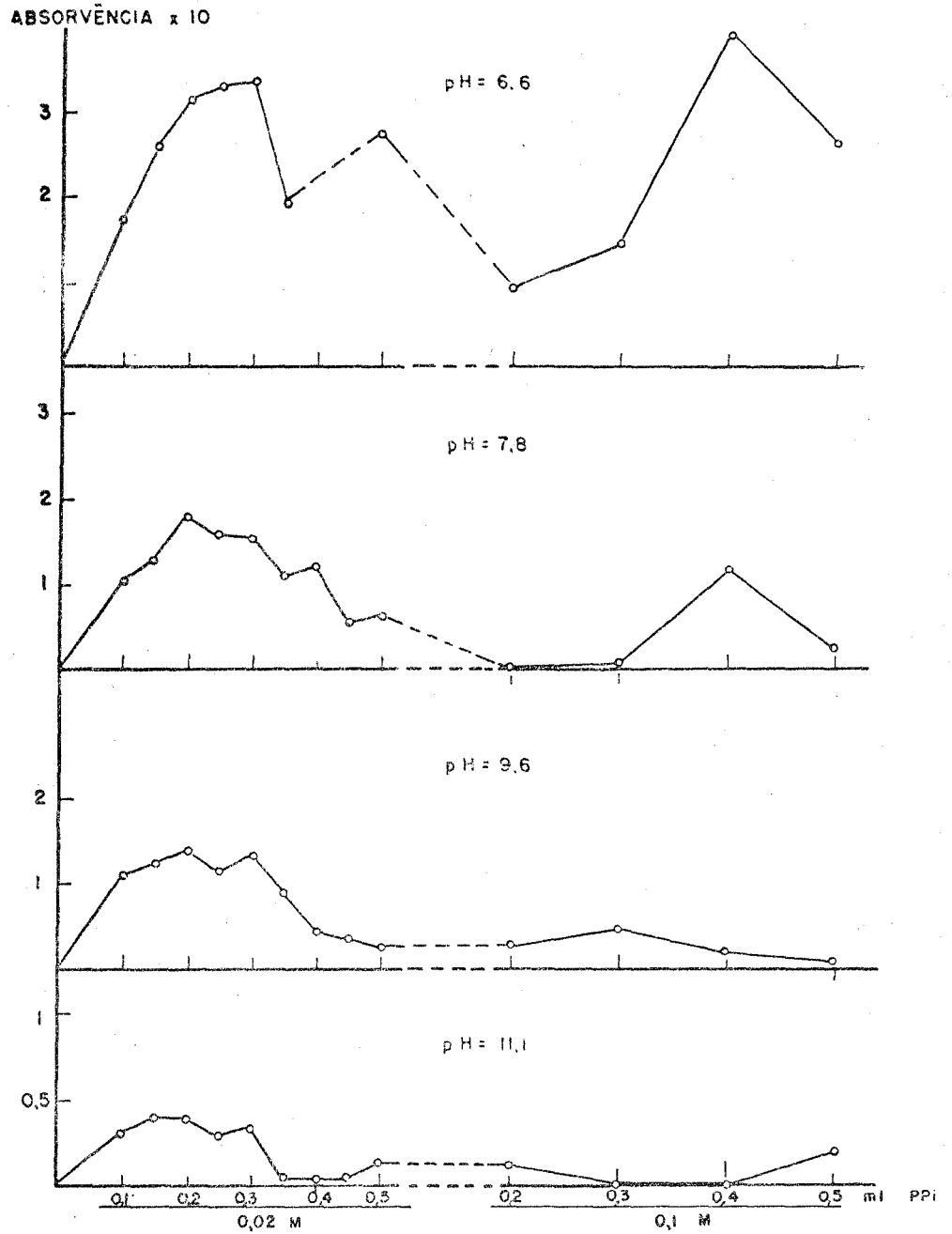


Gráfico 10: Fração de núcleos hepáticos

— Efeito inibitório de excesso de substrato.

Primeiramente, o comportamento das enzimas tipo I e tipo II é diferente., tanto na concentração para atividade máxima, como na intensidade de inibição, nas mesmas concentrações de substrato. Isto vem novamente ilustrar a diferenciação entre os dois, e de maneira análoga, com o tipo III.

Em segundo lugar, o grau de inibição para as concentrações testadas não corresponde ao que se observou em pirofosfatases inorgânicas de levedura (199). Nesta, a concentração de substrato da ordem de 10^{-2} M causava uma inibição de somente 38 %. Na pirofosfatase inorgânica hepática (pH ótimo de 7 a 8), estudada por Swanson (169), a inibição completa se verificava em concentrações um pouco superiores a 10^{-2} M, de maneira semelhante ao observado com a enzima do tipo II acima.

Um terceiro aspecto refere-se ao efeito de o excesso de substrato não somente inibir a hidrólise enzimática, mas, em presença de preparado nuclear, protêico, se hidrolisar menos - do que o pirofosfato inorgânico do ensaio em branco. Isto foi observado com relativa constância, particularmente com a enzima do tipo II, em concentrações em torno de $3,5 \cdot 10^{-2}$ M. Com os dados à mão é praticamente impossível estabelecer-se uma interpretação desta observação. Para tal, seria necessário uma confirmação mais ampla da observação e um estudo especial da mesma.

A interpretação do mecanismo desta inibição ainda não encontrou denominador comum. Dixon (200) menciona duas possibilidades à base de estudos feitos com pirofosfatase inorgânica de le-

veduras:

a)- Excesso de pirofosfato fixaria o ion Mg^{++} , assim diminuindo a concentração efetiva d'êste ativador de enzima até zero, atingindo a inibição completa.

b)- Por outro lado propõe que o verdadeiro substrato seria $MgP_2O_7^{--}$ e não pirofosfato livre. Com excesso de pirofosfato, aquêla parcela que permaneceria livre, estabeleceria uma inibição completa com o substrato real.

De fato, foi verificado que, se paralelamente fôr elevada a concentração de ion Mg^{++} com a concentração do substrato, a inibição é bem mais reduzida.

Nêste trabalho não foi desenvolvido o estudo particular da inibição por excesso de substrato. Seria interessante fazer várias curvas de substrato, com valôres crescentes de concentração do ion Mg^{++} , usando as enzimas hepáticas nucleares, e testar assim as hipóteses acima. Mas, mesmo assim, algumas observações neste sentido podem ser feitas. Assim, examinando com cuidado os resultados, tanto do gráfico 8 como do gráfico 10, em condições de equimolaridade dos ions pirofosfato e ions Mg^{++} já houve acentuada inibição em, praticamente, todos os casos. Isto não harmoniza com a segunda hipótese quanto à natureza do verdadeiro substrato, ainda mais considerando que a atividade máxima foi alcançada, quanto se pode julgar - pelos dados obtidos, em concentrações de substrato aproximadamente a metade, em relação à concentração do ion Mg^{++} . Além disto, pareceu retroceder, em algumas instâncias, o que não harmoniza com esta mesma interpretação. Quanto à primeira hipótese,

será feito um comentário, no seguinte sub-ítem.

c)- Efeito de variação da concentração do ion Mg^{++} .

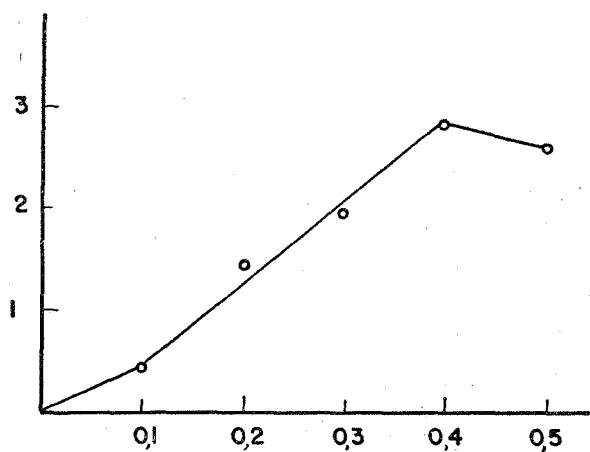
Executou-se um conjunto de curvas de concentração do ion Mg^{++} , para os 4 pHs, utilizando uma fração nuclear preparada a partir de fígado de uma cobaia albina, sexo feminino, com peso de 440 g. Seguiu-se o seguinte esquema de incubação (em ml) :

TUBOS	0	1	2	3	4
Tampão	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
PPi 0,01 M	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
MgCl ₂ 0,02 M	-	0,1	0,2	0,3	0,4
MgCl ₂ 0,1 M	-	-	-	-	-
H ₂ O	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1
Núcleo	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
VOLUME TOTAL	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
TUBOS		5		6	
Tampão		0,7		0,7	
PPi 0,01 M		0,5		0,5	
MgCl ₂ 0,02 M		0,5		-	
MgCl ₂ 0,1 M		-		0,1	
H ₂ O		-		0,4	
Núcleo		0,1		0,1	
VOLUME TOTAL		1,8		1,8	

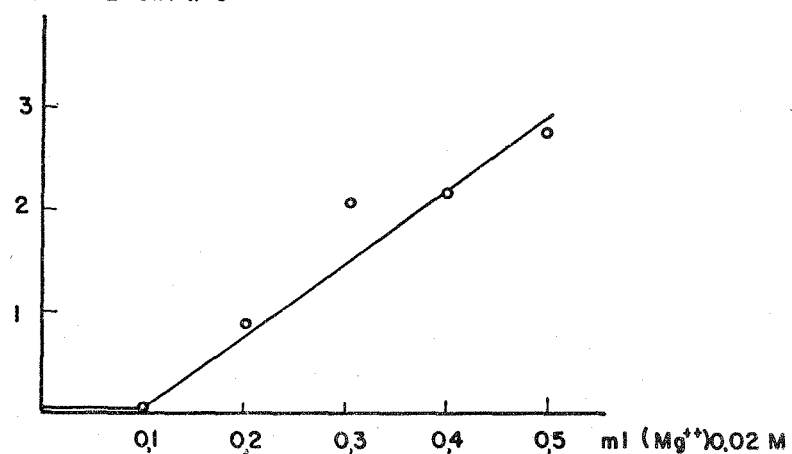
O ensaio em branco, como anteriormente, foi feito substituindo, para cada tubo das 4 séries, o preparado nuclear por igual volume de água. Com a fração nuclear presumivelmente possuía presença de ion Mg^{++} , "endógeno", foi feita para cada série, uma incubação completa, porém sem acrescentar ion Mg^{++} , (em igual volume total), o que permitiu aferir o efeito do mesmo. Os resultados desta incubação foram deduzidos das leituras dos demais tubos ensaiados.

O gráfico 11 ilustra os resultados obtidos. Há uma resposta continuada da atividade enzimática à concentração de ion Mg^{++} . Porém, surgiu interesse de examinar o efeito de maiores concentrações de ions Mg^{++} , por um lado, porque a curva correspondente ao pH=6,6 indicava um eventual efeito inibitório. Além disto, haveria uma possibilidade de obter alguma elucidação referente à primeira hipótese da inibição por excesso de substrato mencionada no item anterior. Se o efeito inibidor do excesso de substrato fôsse devido ao fato de combinar o ion Mg^{++} , diminuindo então a sua concentração efetiva como cofator ao ponto de torná-la igual a zero, uma vez que a inibição pode ser tornada completa desta maneira, então excesso de ion Mg^{++} poderia eventualmente, ter um efeito de inibição relativamente acentuado, diminuindo a concentração efetiva do substrato. Evidentemente, não se aguardaria uma resposta quantitativamente proporcional, porque a diminuição do ion Mg^{++} corresponderia ao decréscimo da concentração de um cofator metálico, enquanto que na diminuição da concentração efetiva de pirofosfato estaria modificando-se a presença de um reagente propriamente dito.

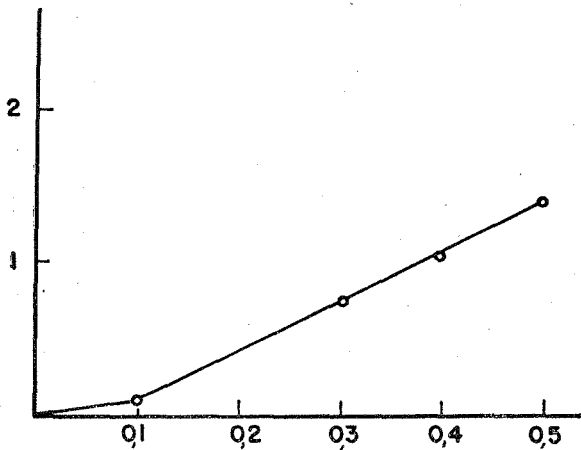
ABSORVÊNCIA x 10



ABSORVÊNCIA x 10



ABSORVÊNCIA x 10



ABSORVÊNCIA x 10

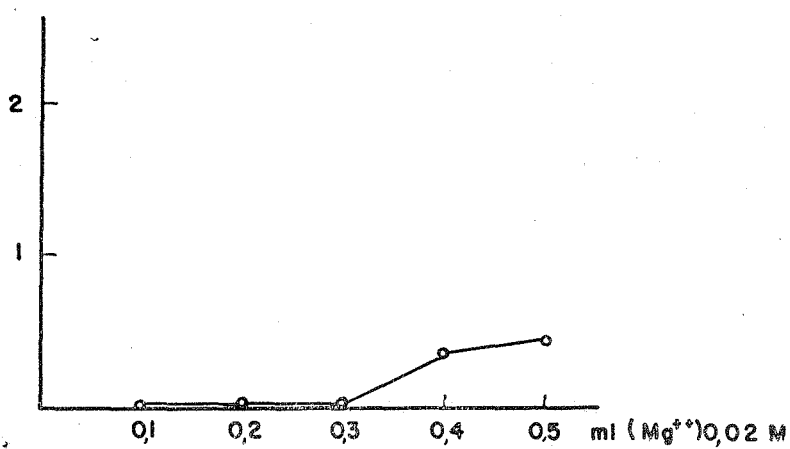


Gráfico 11: Fração de núcleos hepáticos

— Efeito da variação de concentração do ion magnésio.

Poder-se-ia desta forma, esperar no primeiro caso, um efeito bem mais drástico do que no segundo. Mas, como um excesso de pirofosfato poderia (dentro da primeira hipótese) levar a uma total eliminação do ion Mg^{++} efetivo, largos excessos dêste poderiam - conduzir a um abaixamento razoável de concentração de substrato, produzindo uma inibição, se não total, pelo menos bastante enérgica.

Com êste objetivo foi executada uma outra série de incubações (4 pHs), usando um preparado nuclear hepático (uma cobaia albina, sexo feminino, pêso de 520 g), e seguindo o esquema abaixo:

TUBOS	0	1	2	3	4
Tampão	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
PPi 0,01 M		0,5	0,5	0,5	0,5
MgCl ₂ 0,05 M	-	-	0,1	0,2	0,3
MgCl ₂ 0,1 M	0,1	-	-	-	-
MgCl ₂ 1 M	-	-	-	-	-
H ₂ O	0,9	0,5	0,4	0,3	0,2
Núcleo	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
VOLUME TOTAL	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
TUBOS	5	6	7	8	9
Tampão	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
PPi 0,01 M	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
MgCl ₂ 0,05 M	0,4	0,5	-	-	-
MgCl ₂ 0,1 M	-	-	0,4	0,5	-
MgCl ₂ 1 M	-	-	-	-	0,5
H ₂ O	0,1	-	0,1	-	-
Núcleo	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
VOLUME TOTAL	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8

O ensaio em branco foi executado como nas vézes anteriores. Nesta curva foi também determinado o efeito do ion Mg^{++} "end&ogeo". Então, para poder deduzir o orto-fosfato proveniente do material nuclear adicionado, foi acrescentado mais um tubo, zero, cujo resultado foi subtra&edil;do das leituras dos outros tubos.

As curvas correspondentes se encontram no gr&afico 12. Resumindo as concentraçoes com efeito m&aximo :

pH	6,6	7,8	9,8	11,1
Concentraçoes de Mg^{++} (em $10^{-3}M$)	5,56	11,2	22,4	--
Grau de inibiçao a 0,27 M	28 %	68 %	51 %	--

É interessante observar que mesmo a concentraçao muito elevada, o ion Mg^{++} n&ao; teve efeito inibitôrio acentuado. S&ocedil;amente a concentraçao muito elevada (0,27 M) do ion Mg^{++} demonstrou uma inibiçao definitiva. Desta forma, a hipôtese a cima mencionada parece ser bastante razo&avel.

d) - Efeito de outros ions s&ocedil;obre a atividade pirofosfat&asica.

V&arios autores observaram inibiçao da pirofosfatase inorg&anica por cations e anions - (169, 199, 189). Além disto, é conhecido que a inibiçao pode ser efetuada por ions c&al;cio, fluoreto e finalmente mono-iodo-acetato (199).

Para os ensaios de inibiçao efetuados neste trabalho foram usadas fraçoes hep&aticas de v&arias cobaias albinas preparadas em condiçoes

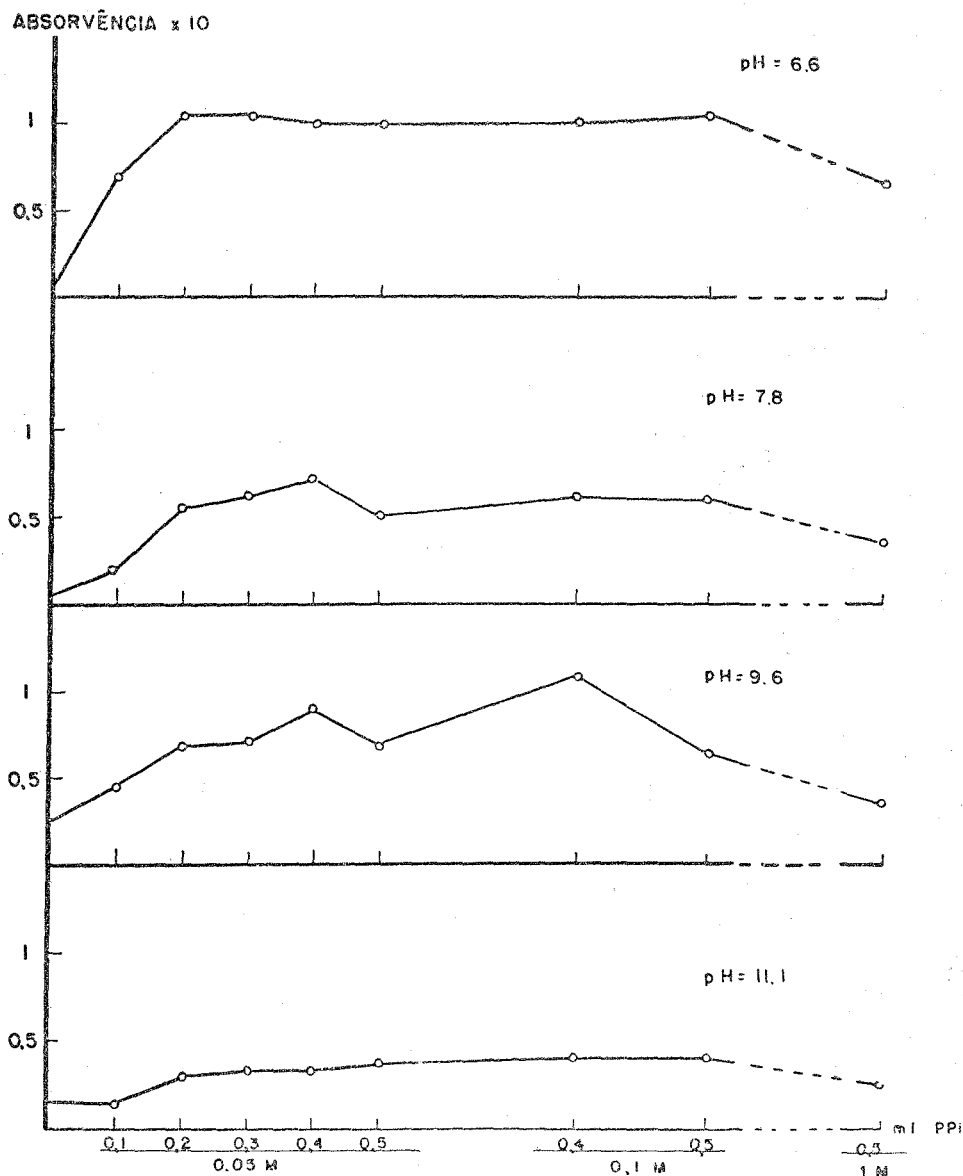


Gráfico 12: Fração de núcleos hepáticos

— Efeito inibitório de excesso de ion magnésio.

semelhantes às anteriores.

O esquema de incubação, correspondente ao gráfico 13 foi constituído do seguinte - (em ml) :

TUBOS	0	1	2	3 até 10
Tampão	0,7	0,7	0,7	0,7
MgCl ₂ 0,1 M	0,1	-	0,1	0,1
PPi 0,01 M	-	0,5	0,5	0,5
H ₂ O	0,6	0,2	0,1	-
Inibidor	-	-	-	0,1
Núcleo	0,1	0,1	0,1	0,1
VOLUME TOTAL:	1,5	1,5	1,5	1,5

O ensaio em branco foi feito como anteriormente. O tubo zero corresponde ao orto-fosfato "endógeno" e seu valor foi deduzido das outras leituras com a ressalva no tubo 1. Os inibidores usados nestas séries de ensaios se encontram assinalados no gráfico 13 e sua concentração é relacionada no ítem 12, Reagentes, do Capítulo anterior. As soluções correspondentes aos ions metálicos foram 0,1 M, a do ácido etilena-diamino-tetra-acético 0,1 M, (em pH=8,0), e a do formaldeído, 10 % (v/v). No meio de incubação estas concentrações foram reduzidas 15 vêzes.

Os resultados demonstrados no gráfico 13 ilustram a ativação intensa causada pelo ion Mg⁺⁺ em todos os 4 pHs. A presença simultânea de ion Ca⁺⁺, em igual concentração anulou, praticamente, todo êste efeito. Com os outros ions testados o resultado foi semelhante. Se no caso do ion Ca⁺⁺ se pode admitir um efeito inibitório--

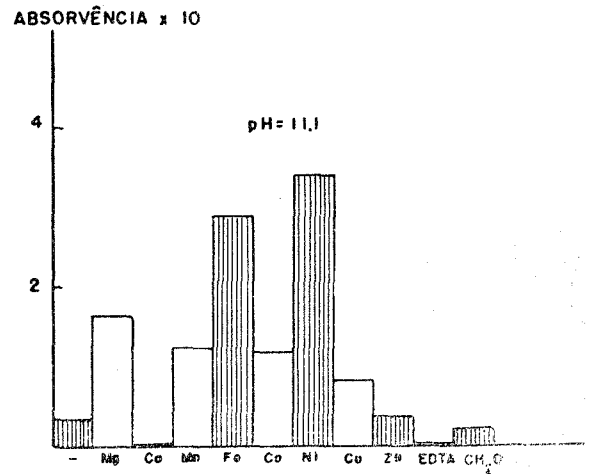
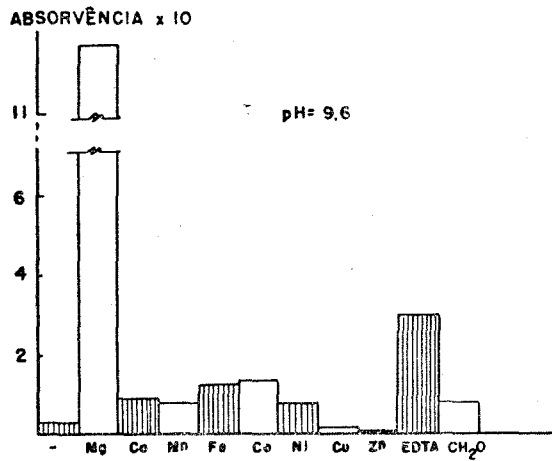
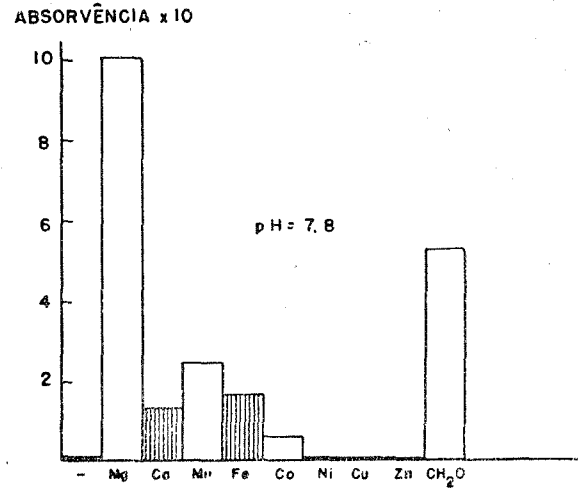
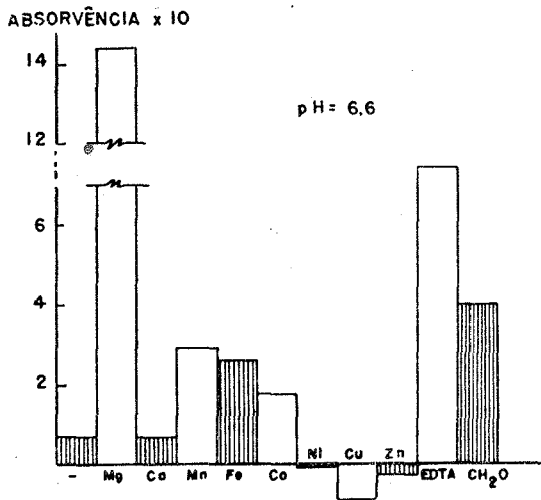


Gráfico 13: Fração de núcleos hepáticos

— Efeito comparativo de inibidores.

rio verdadeiro, nos demais ions é muito aceitável a suposição de que a sua presença reduzisse em muito a concentração efetiva de substrato, uma vez que - seus sais pirofosfatos são bastante insolúveis. Por esta razão, não se achou de muita valia examinar, neste trabalho, mais de perto a ação destes últimos ions. Curioso, certamente, é o efeito dos mesmos na enzima do tipo IV (pH=11,1) onde ions como o Fe^{++} e Ni^{++} tiveram efeito de ativação maior que o do ion Mg^{++} , enquanto que os ions Mn^{++} , Ca^{++} e Cu^{++} apresentaram efeito semelhante a êsse. Este aspecto particular não foi examinado com mais minúcias aqui, porém constitui tema interessante, que deverá ser vasculhado pelo autor em outra oportunidade.

O efeito inibitório do quelante - EDTA, esperado, certamente foi causada pela diminuição da concentração eficiente do ion Mg^{++} . A inibição pela ação do formol, aliás não tão acentuada na enzima tipo II sugere participação de grupo amino no mecanismo de ação da enzima.

Para examinar mais de perto o antagonismo dos ions Mg^{++} e Ca^{++} , foi executada um grupo de ensaios, obedecendo ao seguinte esquema - de incubação (em ml) (ver tabela à pag. 85).

A substituição de fração nuclear por água constituiu o ensaio em branco. O tubo zero se destinou a avaliar o orto-fosfato "endógeno" em presença do ion Mg^{++} e seu valor foi deduzido das leituras dos tubos até o número 6. O tubo 8 foi destinado à correção semelhante ao tubo 7, - permitindo a avaliação do orto-fosfato "endógeno" - em presença exclusiva do ion Ca^{++} . Como os efeitos observados nos tubos zero e 8 foram praticamente i

TUBOS	0	1	2	3	
Tampão	0,7	0,7	0,7	0,7	
MgCl ₂ 0,1 M	0,1	0,1	0,1	0,1	
CaCl ₂ 0,02 M	-	-	0,1	0,2	
PPi 0,01 M	-	0,5	0,5	0,5	
H ₂ O	1,0	0,5	0,4	0,3	
Núcleo	0,1	0,1	0,1	0,1	
VOLUME TOTAL:	1,9	1,9	1,9	1,9	
TUBOS	4	5	6	7	8
Tampão	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
MgCl ₂ 0,1 M	0,1	0,1	0,1	-	-
CaCl ₂ 0,02M	0,3	0,4	0,5	0,5	0,5
PPi 0,01 M	0,5	0,5	0,5	0,5	-
H ₂ O	0,2	0,1	-	0,1	0,6
Núcleo	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
VOLUME TOTAL:	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9

dênticos e bastante reduzidos, não houve dificuldade na valorização dos resultados obtidos para os tubos em que a presença de ions Mg⁺⁺ e Ca⁺⁺ foi simultânea. O exame do pH=11,1 foi omitido aqui, como em outros ensaios, por ter resposta enzimática de valores muito reduzidos e dificilmente interpretáveis.

O gráfico 14 representa os resultados obtidos. O ion Ca⁺⁺ exerce um efeito inibitório acentuado, já em concentração 5 vezes menor do que a do ion Mg⁺⁺; em condições equimolares praticamente anula a ativação devida ao mesmo. O ion Ca⁺⁺, isoladamente, não exerce efeito nenhum, com-

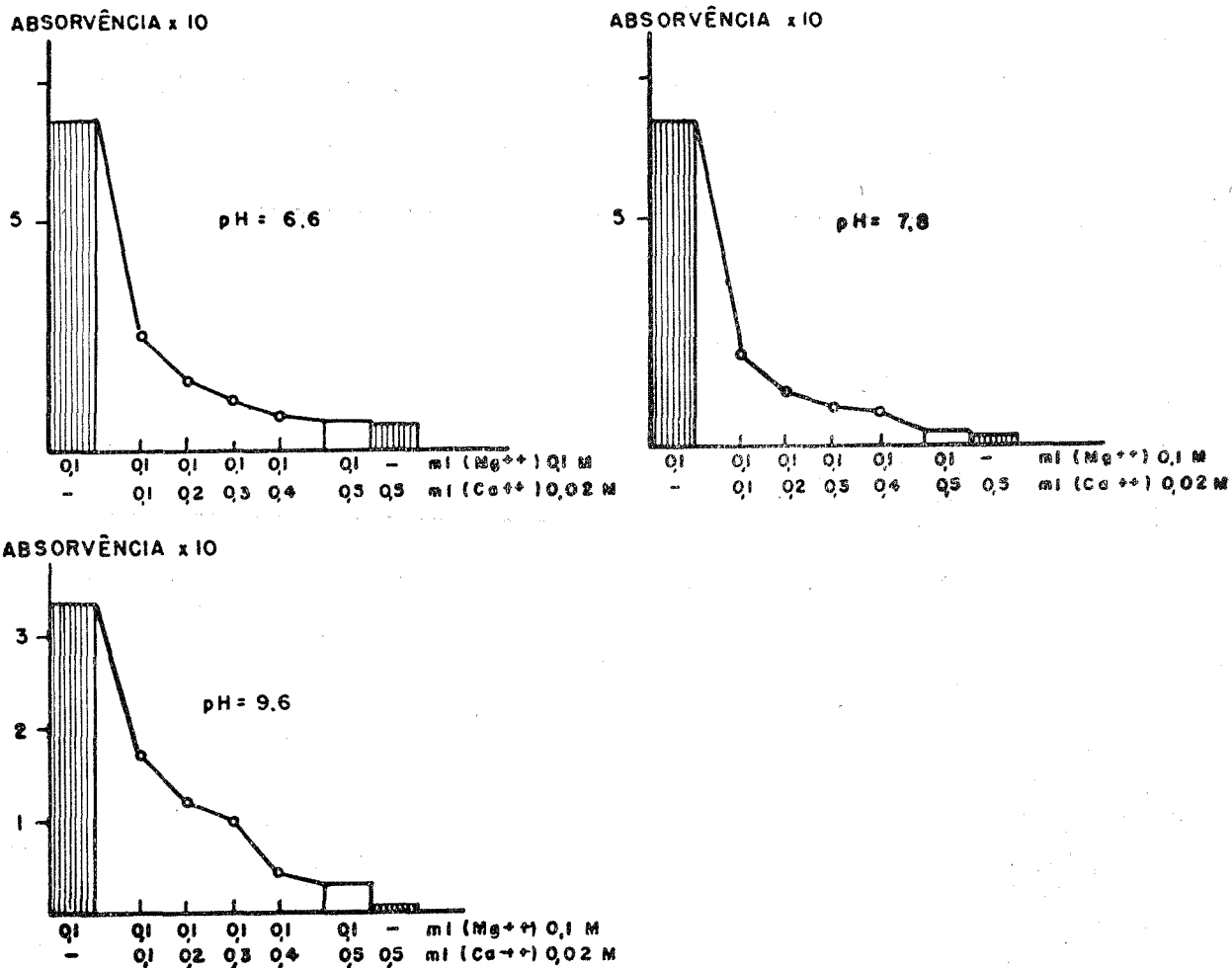


Gráfico 14: Fração de núcleos hepáticos
 — Efeito inibitório do ion cálcio.

parado com a incubação na qual também está presente o ion Mg^{++} .

Outras inibições também foram testadas. Neste sentido foi executado o seguinte esquema de incubação, para as três séries de pH, excluindo o pH=11,1, (em ml):

TUBOS	0	1	2	3	4
Tampão	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
MgCl ₂ 0,1 M	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
PPi 0,01 M	-	0,5	0,5	0,5	0,5
NaF 0,02 M	-	-	-	-	0,1
pHMB	-	0,1	-	-	-
KCN 0,1 M	-	-	0,1	-	-
H ₂ O	1,0	0,4	0,4	0,5	0,4
Núcleo	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
VOLUME TOTAL:	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9
TUBOS	5	6	7	8	
Tampão	0,7	0,7	0,7	0,7	
MgCl ₂ 0,1 M	0,1	0,1	0,1	0,1	
PPi 0,01 M	0,5	0,5	0,5	0,5	
NaF 0,02 M	0,2	0,3	0,4	0,5	
pHMB	-	-	-	-	
KCN 0,1 M	-	-	-	-	
H ₂ O	0,3	0,2	0,1	-	
Núcleo	0,1	0,1	0,1	0,1	
VOLUME TOTAL:	1,9	1,9	1,9	1,9	

Condições de ensaio em branco e tu bo zero, para a aferição do orto-fosfato "endógeno" foram semelhantes aos casos anteriores. O resultado se encontra representado no gráfico 15.

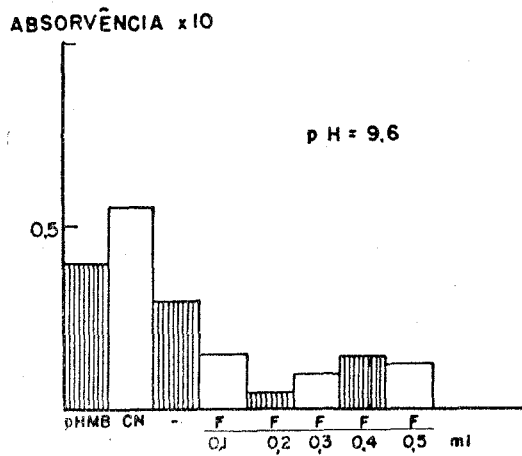
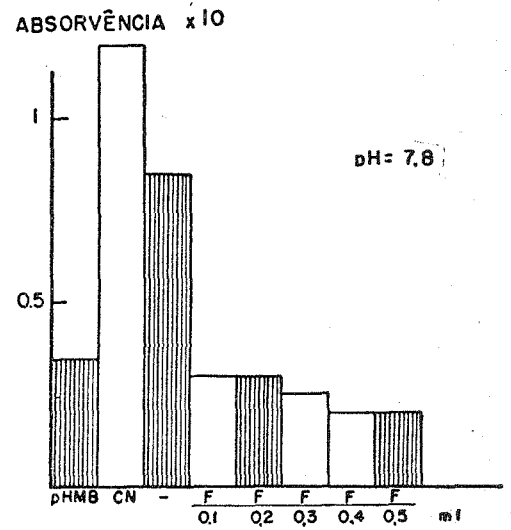
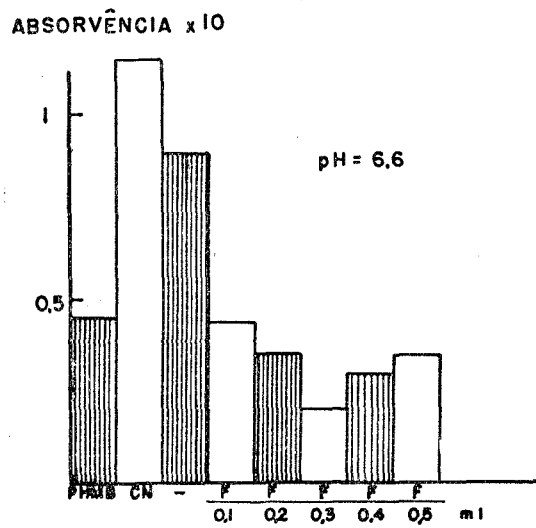


Gráfico 15: Fração de núcleos hepáticos
 — Efeito de inibidores. Curva do ion fluoreto.

O p-hidroxi-mercuri-benzoato (pHMB) apresentou uma redução da atividade pirofosfatásica a cerca de 50 % nos dois primeiros pHs, mas não se caracterizou, curiosamente, no pH=9,6 . Isto evidencia a participação do grupo sulfidrila no mecanismo da ação enzimática dos dois primeiros casos, mas não na do último.

Outro aspecto interessante que deve ser assinalado é que o ion cianeto, de maneira sistemática, aumentou o efeito normal da ação pirofosfatásica nos três pHs testados. Nesta altura , não é possível apresentar interpretação para esta constatação experimental.

Como era previsto, o ion fluoreto inibe enèrgicamente, já a concentrações reduzidas, ($1,05 \cdot 10^{-3} M$), baixando a atividade a praticamente até a metade. Deve ser assinalado, porém, que não chegou a anular a mesma, ainda em concentração 5 vèzes superior, nem mostrando indícios que tal fôsse possível com maior elevação da sua concentração.

Os ensaios descritos acima, nos fornecem uma grande soma de informações e sugerem, por outro lado, um número amplo de investigações sobre êste tema. Constituiria isto novo tópico de pesquisa, o qual não era o propósito imediato de estudo neste trabalho. Mesmo assim, os resultados obtidos permitem os dados de caracterização das atividades enzimáticas em foco.

e)- Efeito da variação do tempo de incubação.

Para esta série de ensaios foi obtida a preparação nuclear de cobaia albina, de sexo feminino, de 360 g de peso. O esquema de incubação seguido é igual ao descrito no item 1 deste Sub-capítulo. Foram testados os 4 pHs e os tempos de incubação variaram de zero, 5, 10, 20, 30, 45, 60 e 90 minutos. As incubações sem fração nuclear foram colocadas no banho de 37⁰ C e a fração nuclear foi adicionada na ordem inversa desta sequência, obedecendo aos intervalos de tempo necessários. O ensaio em branco seguiu o mesmo critério que o estabelecido anteriormente. Um tubo sem pirofosfato, incubado por 90 minutos mostrou uma quantidade praticamente nula de orto-fosfato "endógeno", não havendo necessidade, portanto, de correções nos resultados dos tubos intermediários.

Os resultados estão representados no gráfico 16. Pode ser observado que as curvas dos três primeiros pHs (o último não permite avaliação segura de seus resultados), aparentemente se desenvolveram como reações de primeira ordem.

f)- Efeito da variação de temperatura de incubação e de preaquecimento da preparação nuclear.

Nesta experiência usou-se preparado nuclear de cobaia albina, sexo feminino, com peso

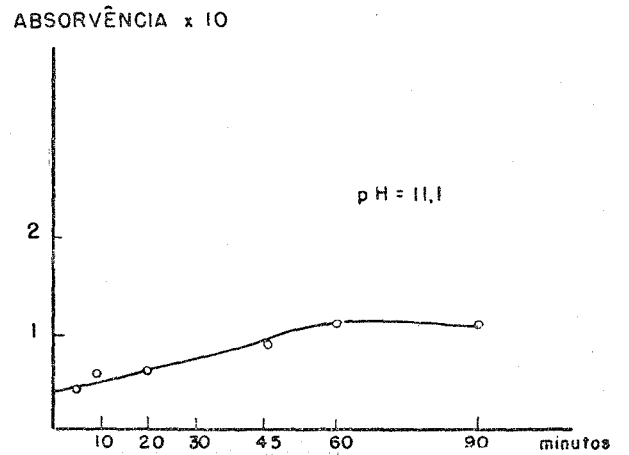
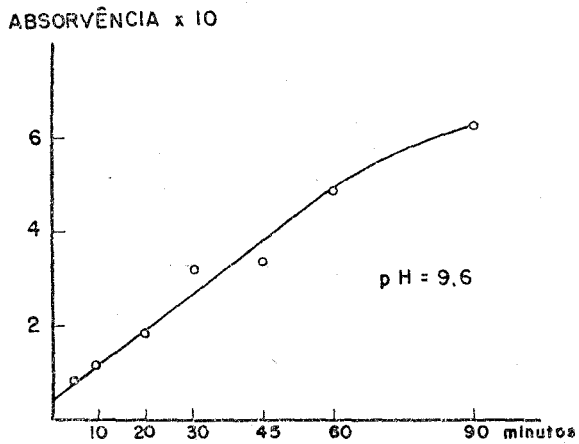
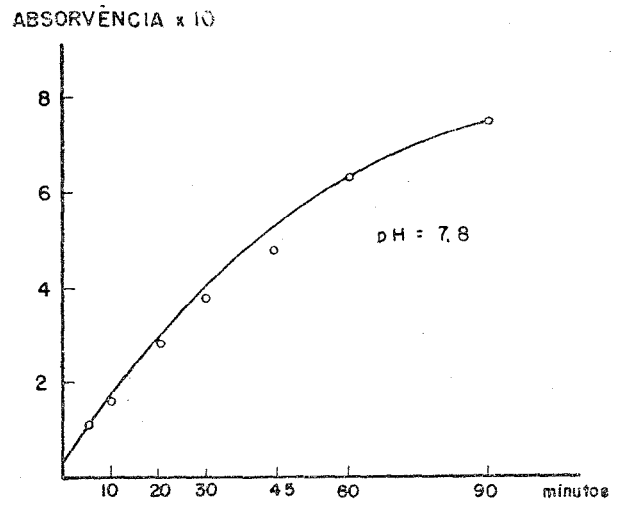
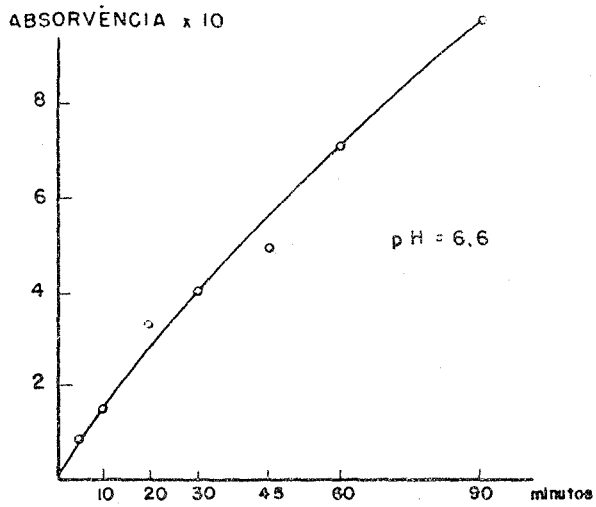


Gráfico 16: Fração de núcleos hepáticos. — Curva de tempo.

de 450 g . O esquema de incubação corresponde ao empregado no ítem 1 d'êste Sub-capítulo. O preaquecimento foi feito, colocando o preparado nuclear , já adicionado com $MgCl_2$, em banhos de 60° e 90° C, pelo prazo de 5 minutos. Logo depois, os tubos foram colocados em gelo picado e então utilizados em incubações normais a 37° C. Além do tubo contrôlle, executado como habitualmente, dois outros tubos foram incubados, um em gelo, na câmara fria, e outro em banho a 50° C .

Os resultados, com três pHs, estão registrados no gráfico 17.

Nos dois primeiros pHs, a incubação a 50° C foi bem mais enérgica do que a observada normalmente, a 37° C . Evidentemente, houve atividade mínima a 0° C.

A experiência com aquecimento prévio se justifica pelo fato de enzimas, como a mioquinase (201), resistirem a temperaturas bem elevadas, por tempo de minutos. No caso desta última enzima, o aquecimento rápido (90° C por 3 minutos) é processo muito útil para sua separação de outras - proteínas desnaturáveis nestas condições. Nos ensaios presentes, porém, observou-se inativação completa, mesmo a 60° C .

B. ATIVIDADES PIROFOSFATÁSICAS EM TECIDO PANCREÁTICO.

Neste Sub-capítulo serão discutidas experiências paralelas e semelhantes às expostas em referência ao tecido hepático. Os diversos aspectos

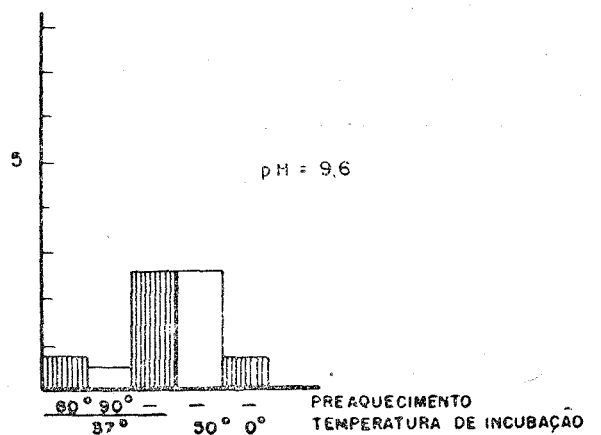
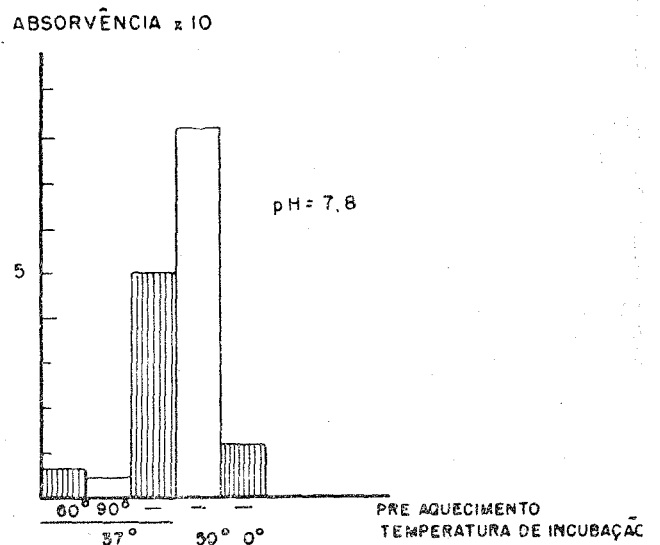
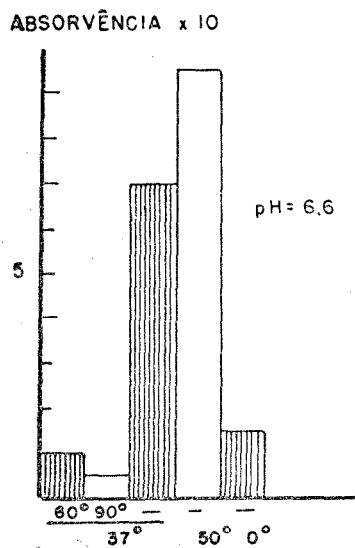


Gráfico 17: Fração de núcleos hepáticos. — Efeito da temperatura.

técnicos já mencionados por ocasião da esquematização experimental, se aplicam da mesma forma para o trabalho com o tecido pancreático e não serão repetidos nesta altura. Os dados, para efeito de clareza, serão apresentados esquematicamente.

1. Homogeneizado Pancreático Total. - Curva de pH

Número total de curvas : 5

Exemplificação: gráfico 18, a partir de homogeneizado pancreático de cobaia albina, sexo feminino, com 525 g de peso.

Resultados: - Sem atividade pirofosfatásica isolada em pH inferior a 5,0

- São assinaláveis 3 a 4 zonas de atividade enzimática:

- uma de pH=7,0 (6,0) até 8,4 , com máximo em 7,8 e eventual acentuação da curva em torno de 6,4 e ocasionalmente 7,0 .

- uma de pH=8,6 até 10,1 , que parece subdividir-se em duas zonas, na altura do pH=9,2; há máximos nos pHs=9,0 e 9,8 .

- uma de pH=11,1 até 11,7 , com máximo em 11,4 .

Comparando com resultado obtido à base de homogeneizado hepático, observa-se marcada semelhança. Somente a atividade pirofosfatásica presente no material pancreático, na altura do pH=9,0, não aparece no primeiro.

A título de experiência piloto, foram feitas várias curvas de pH (cinco) com o homo

ABSORVÊNCIA x 10

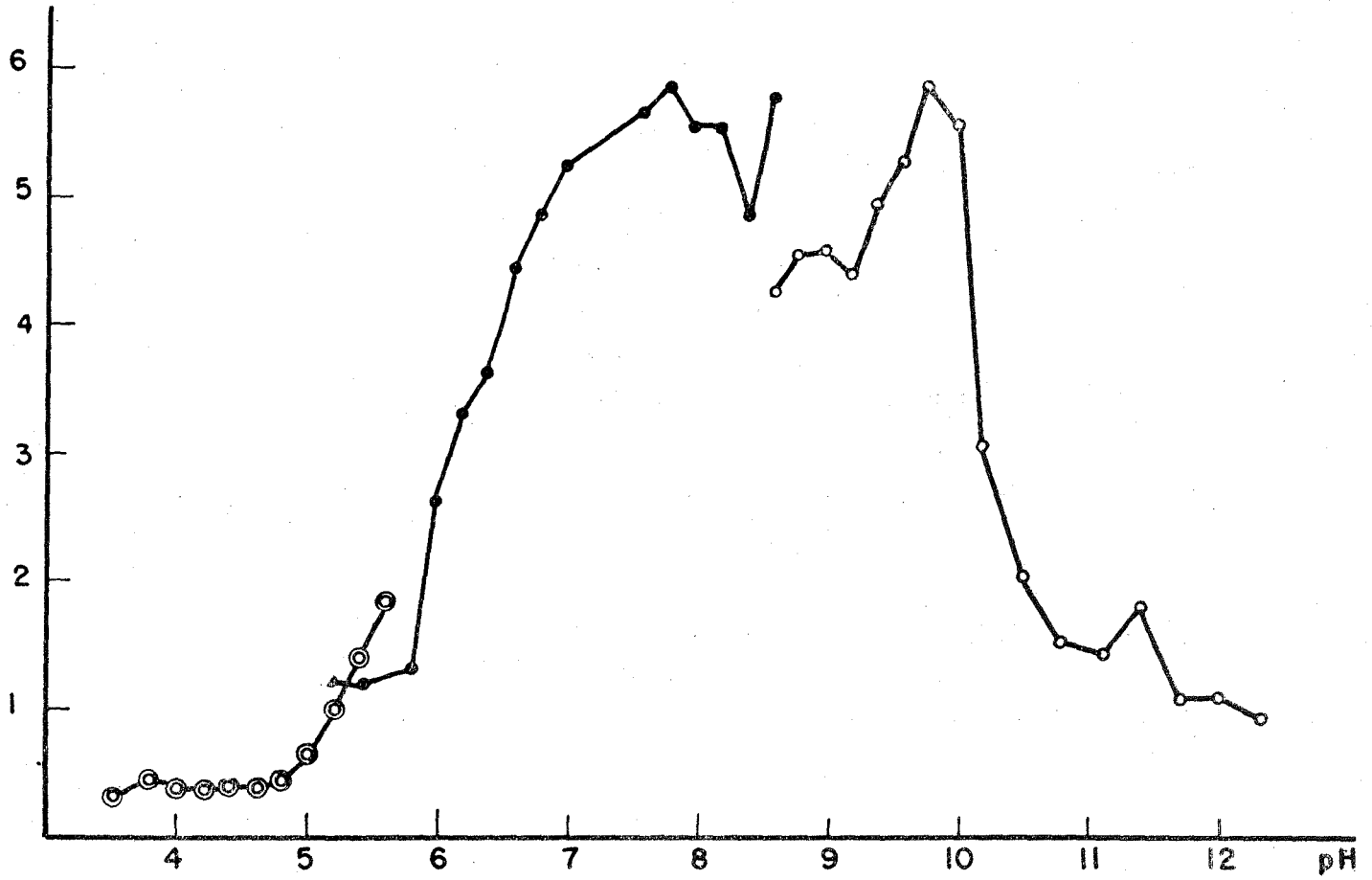


Gráfico 18: Homogeneizado pancreático total. — Curva de pH.

geneizado total de rim (exemplo: gráfico 19).

Neste homogeneizado, várias zonas de atividade surgiram, com pHs ótimos em 7,4 , 8,4, 8,8 , 9,6 e 11,4 , além de uma indicação de atividade pirofosfatásica em torno do pH=4,0 até 5,5.

Neste caso, a atividade em torno do pH=9 , também aparece, além de outra, na altura do pH=8,4 , inexistente nas anteriores preparações correspondentes. Também é interessante assinalar o aparecimento eventual de atividade em pH bastante ácido.

2. Fração de "núcleos pancreáticos" - Curva de pH.

Número total de curvas : 6

Exemplificação: gráfico 20 , obtido com preparação nuclear pancreática de cobaia albina, sexo feminino, com 575 g de peso.

Resultados: - Não houve atividade pirofosfatásica isolada em pH inferior a 5,0 , nem em torno do pH=11 .

- Podem ser destacadas duas zonas gerais de atividades pirofosfatásicas:

- uma de pH=7,0 (6,0) até 8,6 , a qual, porém apresenta máximos em 7,2 , 7,8 e 8,2 . A distinção entre estes dois últimos , não foi constante.
- uma do pH=9,0 até 10,1 , com máximo em torno de 9,6 .

ABSORVÊNCIA x 10

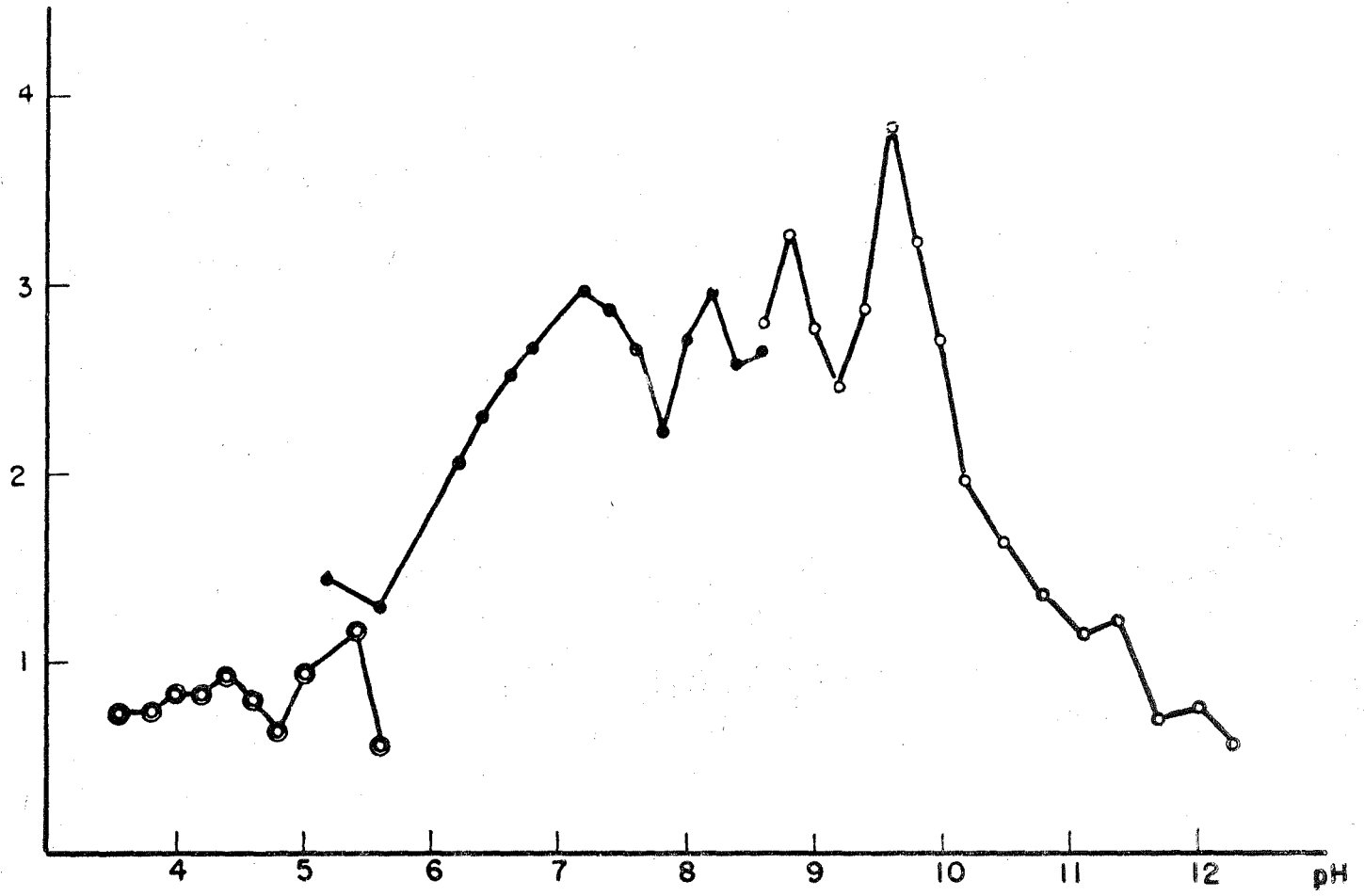


Gráfico 19: Homogeneizado total renal. — Curva de pH.

ABSORVÊNCIA x 10

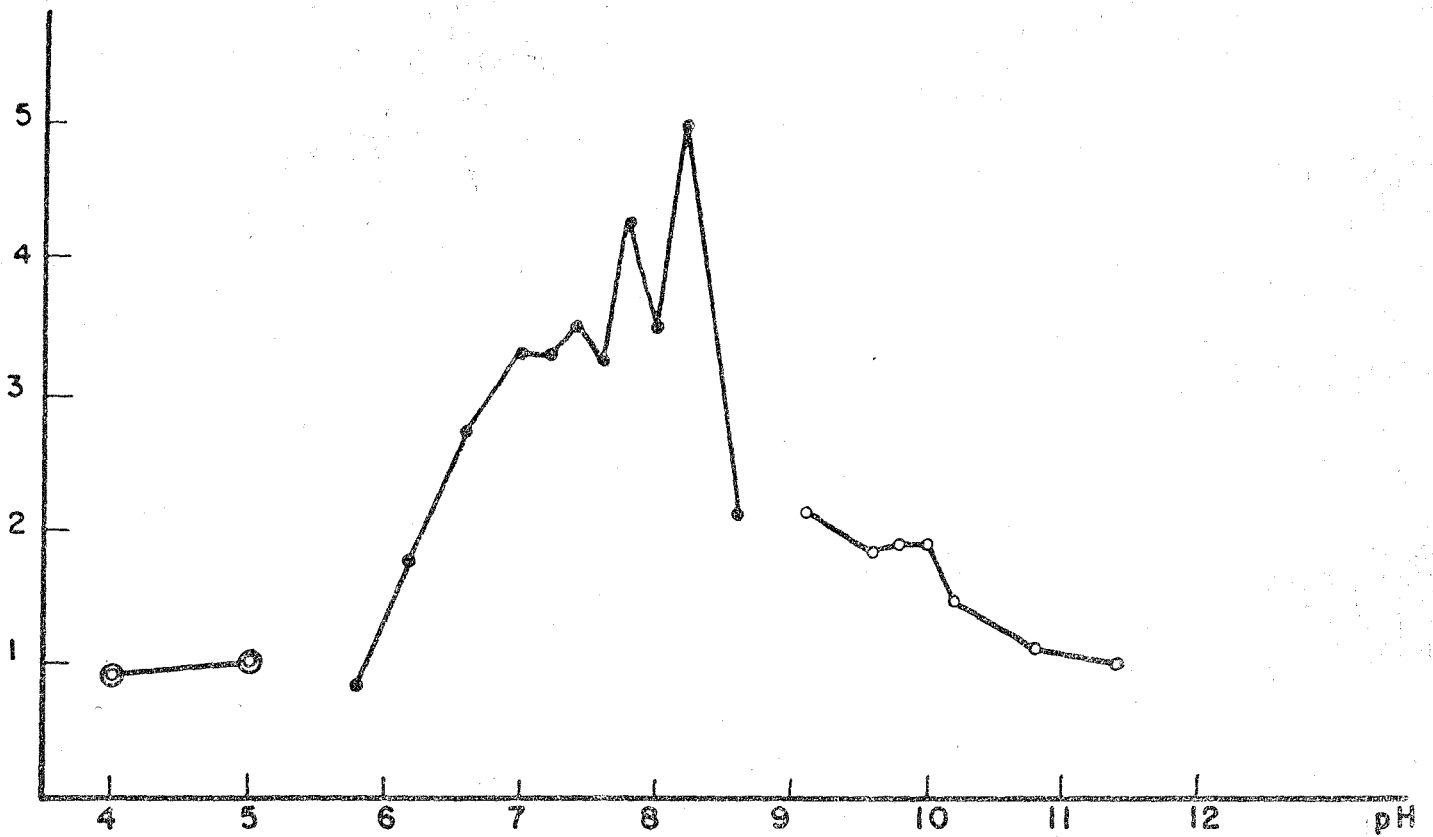


Gráfico 20: Fração de núcleos pancreáticos. — Curva de pH

Comparado com os resultados correspondentes do fígado, observa-se ausência nos presentes resultados de atividades especiais em pH inferior a 7,0 , bem como em pH em torno de 11,0 .

Curvas de pH feitas com preparados nucleares renais (em número de 5) , representadas por um caso no gráfico 21 permitem uma constatação interessante: Além de apresentarem dois máximos, aproximadamente semelhantes aos dos homogeneizados anteriores (em 7,2 e 9,6) acusam dois máximos de atividades novas neste tipo de fração sub-celular : no pH 8,6 e novamente em torno do pH 4,5 , ambos pontos perfeitamente harmonizados com a curva de pH de homogeneizado total deste tecido (gráfico 19).

3. Fração de "mitocôndrias pancreáticas" - Curva de pH

Número total de curvas : 5

Exemplificação: gráfico 22 , executado com preparação mitocondrial pancreática de cobaia albina, sexo feminino de 250 g de peso.

Resultados: - Não pôde ser individualizada atividade pirofosfatásica em pH inferior a 5,0 .

- Pelo menos 4 zonas de atividade podem ser destacadas:

- uma de pH=6,4 até 7,4 (com zona presumível no pH=5,4 até 6,4) , apresentando um pH ótimo em 7,0
- uma de pH=7,6 até 8,2 com máximo em 8,0 .

ABSORVÊNCIA x 10

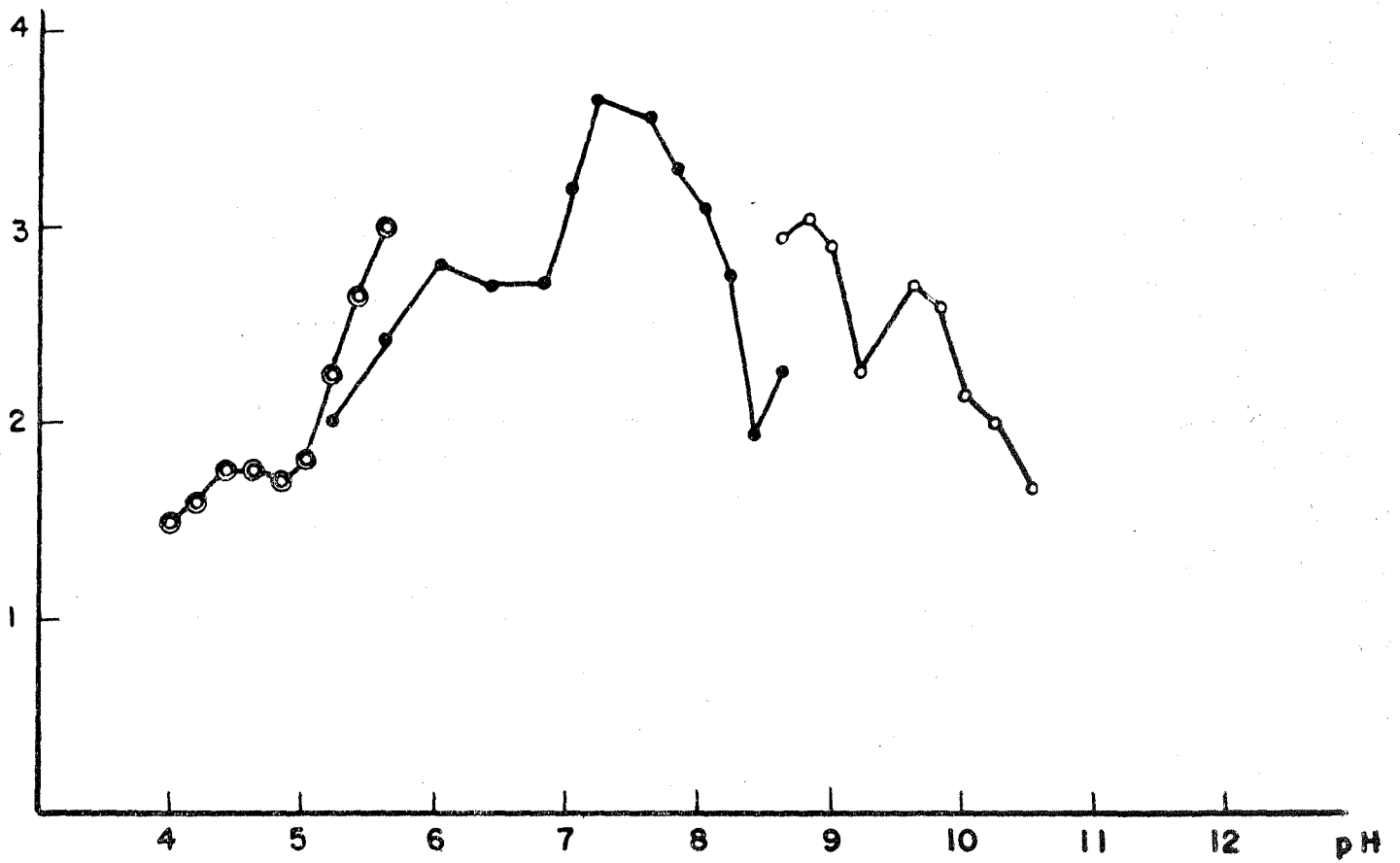


Gráfico 21: Fração de núcleos renal. — Curva de pH.

ABSORVÊNCIA x 10

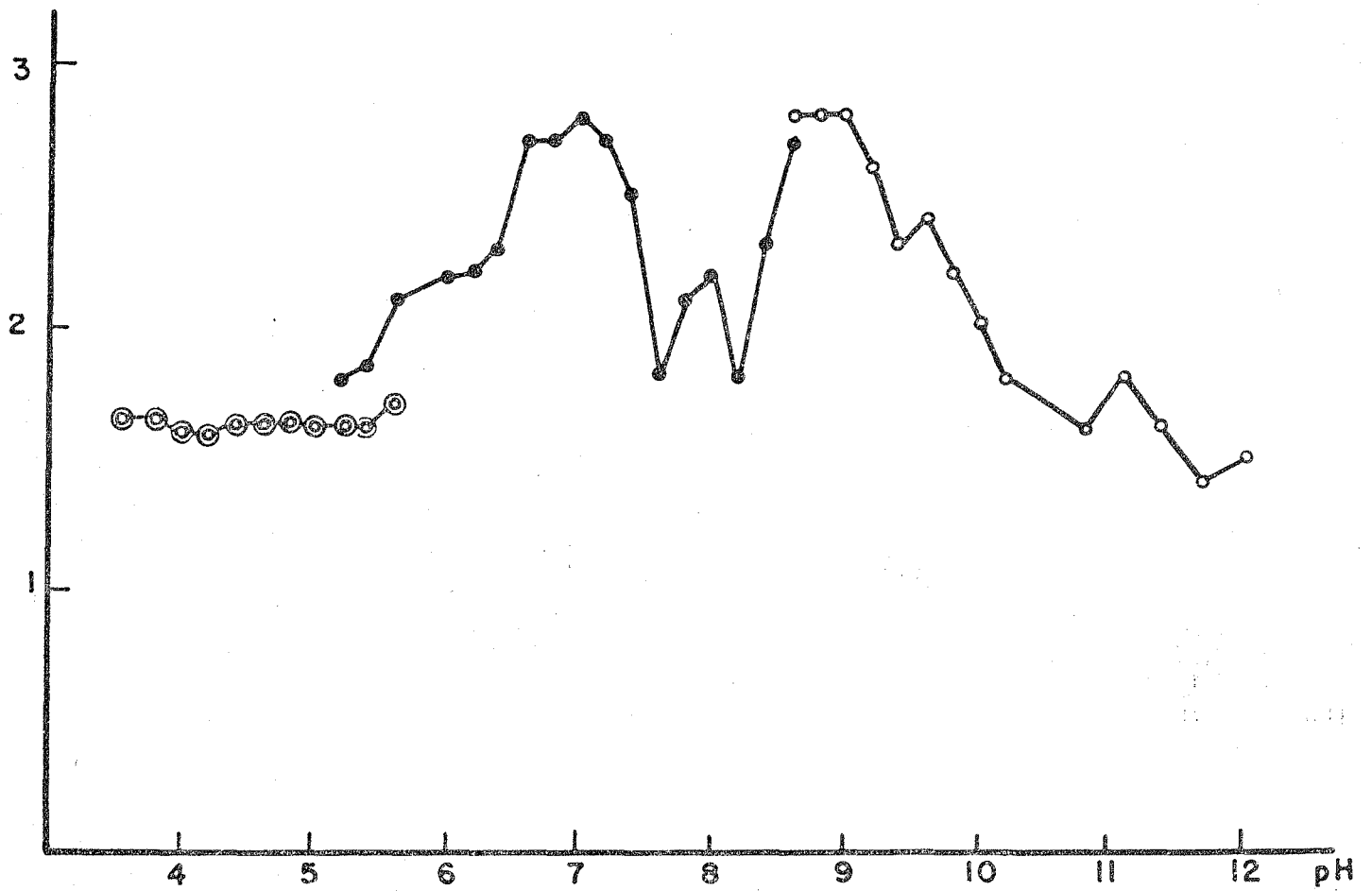


Gráfico 22: Fração de mitocôndrias pancreáticas. — Curva de pH

- uma de pH=8,6 até 10,0 , com máximo em torno de 8,8 e indicação de um pH ótimo em torno de 9,6 .
- uma de pH=10,8 até 11,7 , com máximo em 11,1

Comparando com os resultados obtidos com frações mitocondriais hepáticas, algumas analogias podem ser assinaladas : Há também máximos em torno dos pHs = 7,8 , 9,6 e 11,1 . Acessoriamente, porém, a fração mitocondrial pancreática apresenta ainda um máximo em pH=8,8 , inexistente no correspondente hepático, e já indicado na curva do homogeneizado total de tecido pancreático.

Deve chamar-se atenção a que a fração mitocondrial pancreática foi a única das frações sub-celulares que apresentou pirofosfatase inorgânica no pH em torno de 11 , já assinalada pelos resultados do homogeneizado total deste tecido. Por analogia, poder-se-ia aventar a hipótese de que também no caso do fígado, esta seria a distribuição da espécie que se convencionou denominar do tipo IV, sendo a atividade constatada no núcleo hepático proveniente de contaminação durante a preparação desta fração.

4. Fração de "microsomas pancreáticas" - Curva de pH

Número total de curvas : 6

Exemplificação: gráfico 23 à base de preparação **microsomal** pancreática de cobaia albina, sexo feminino, com 475 g de peso.

Resultados: - Não se pôde observar atividade pi

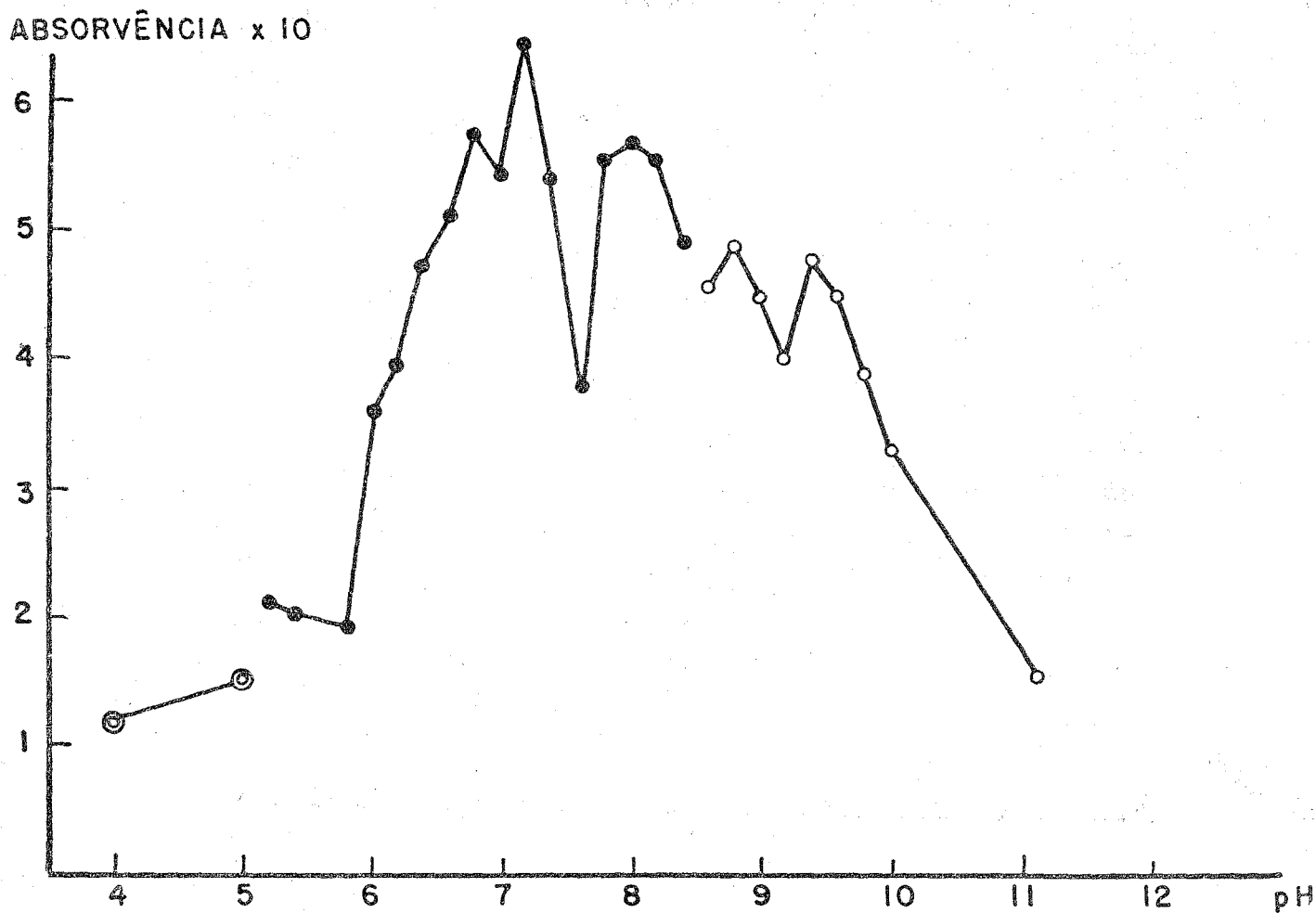


Gráfico 23: Fração de microsomas pancreáticas. — Curva de pH

rofosfatásica individual em pH inferior a 5,0 ,nem em tórno de pH=11 .

- Acima do pH=6 pelo menos três zo nas nítidas de atividade podem ser caracterizadas:

- uma de pH=6,0 até 7,6 , com má ximo mais frequente em 7,4 e outro surgindo às vêzes em pH=6,8 .
- uma de pH=7,6 até 8,4 , com má ximo em 8,0 .
- uma de pH=8,6 até 10,0 , com máximo em 8,8 e 9,6 .

Cotejando êstes dados, com os ob servados em preparações microsomiais hepáticas, po demos generalizar que há um paralelismo de máximos de atividade em pHs em tórno de 7 , de 8 e de 9 a 10, com a diferença de que no caso do material pan creático a atividade em tórno de pH=7 se subdivi de aparentemente em duas.

A fração microsomial pancreática, porém, apresenta novamente, em adição, uma ativida de na altura do pH=8,8 .

5. Fração de "sobrenadante citoplasmático pancreático" - Curva de pH

Número total de curvas : 6

Exemplificação: gráfico 24 , obtido com a prepa ração de sobrenadante citoplasmático de pâncreas de cobaia albina, sexo feminino, com pêso de 365 g.

Resultados: - Não foi evidenciada atividade pi rofosfatásica específica em pH

ABSORVÊNCIA x 10

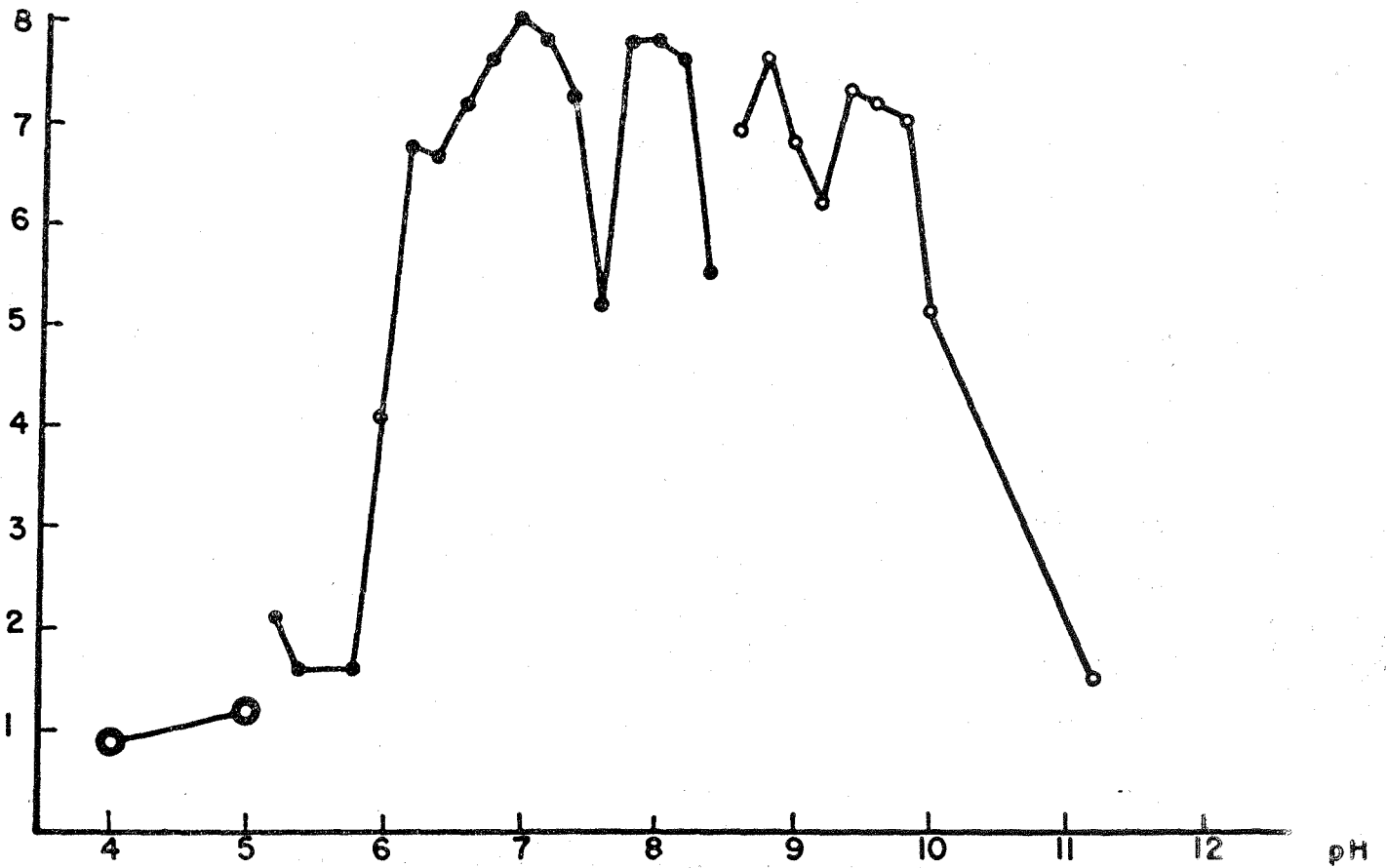


Gráfico 24: Fração sobrenadante citoplasmático de pâncreas. —
Curva de pH.

inferior a 5,0 , nem em tórno de pH = 11 .

- Quatro zonas de atividade enzimática foram evidenciadas:

- uma de pH=6,0 até 7,6 , com um máximo em 7,0 e uma deflexão insistente, às vèzes com leve pico, no pH=6,2 .
- uma de pH=7,6 até 8,4 , com um máximo em 8,0 .
- uma de pH=8,6 até 9,2 , com um máximo permanente em 8,8 .
- uma de pH=9,2 até 10,0 , com um máximo em tórno de 9,4 .

Cabe nòvamente uma comparação com resultados correspondentes de material hepático, devendo ser assinalado que há uma relativa sobreposição de atividades em pH levemente superior a 6 , em tórno de 7 e em tórno de 8 , bem como na altura do pH=9,4 . Mais uma vez, porém, surge na preparação pancreática, a ação pirofosfatásica inorgânica no pH=8,8 , e que parece ser uma característica peculiar dèste tecido.

6. Comentário comparativo sôbre as curvas de pH das quatro frações sub-celulares.

Os resultados dos 5 ítems anteriores se encontram resumidos no gráfico 25 e sugerem o seguinte comentário:

- a)- Generalizando, podem ser assinaladas nas frações pancreáticas, não quatro, mas provàvelmente

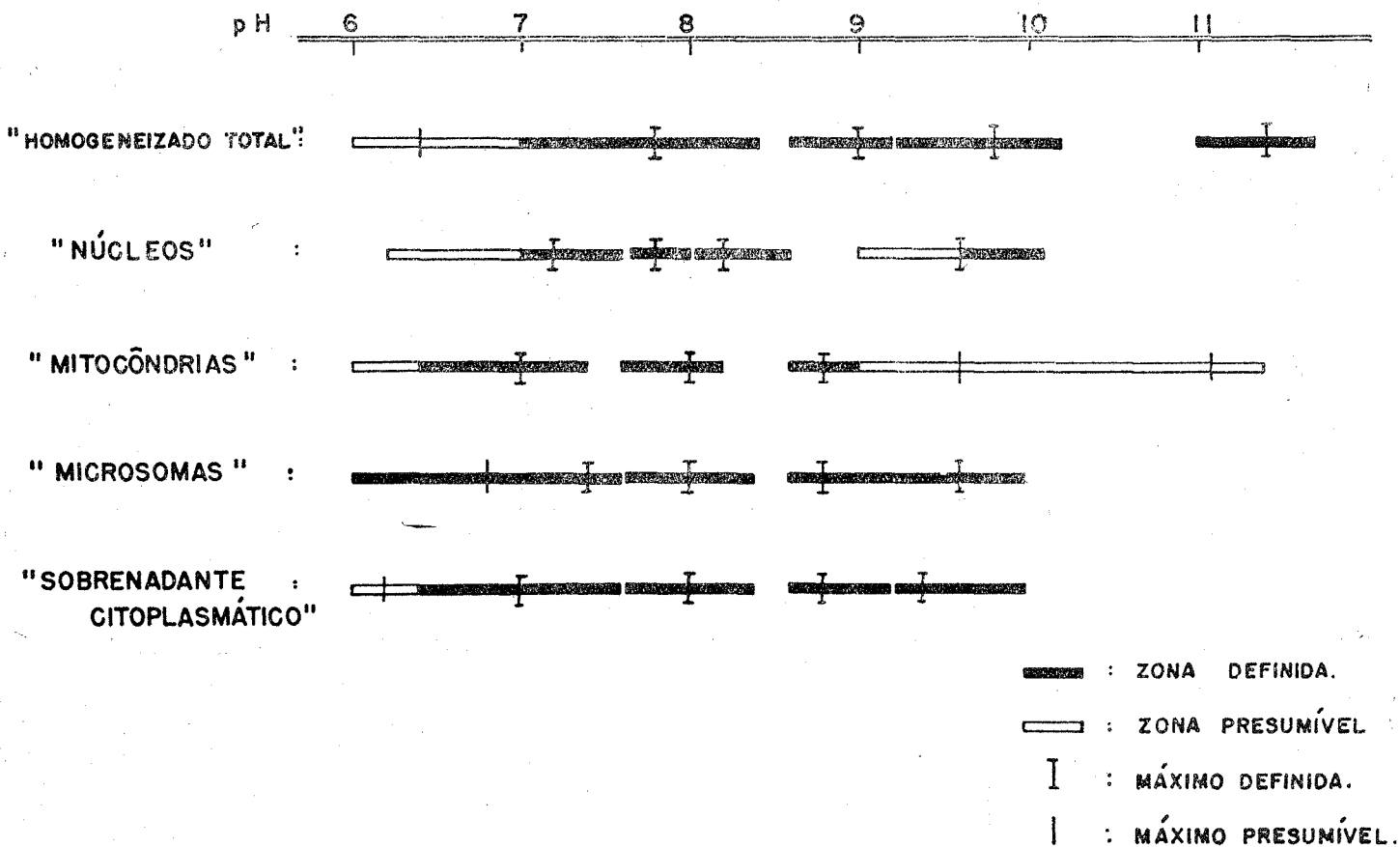


Gráfico 25: Tecido pancreático. —

— Comparação das zonas de atividade e máximos de pH.

te seis atividades pirofosfatásicas diferentes. Conservando a classificação, adotada na alínea a) - do item correspondente a êste, no estudo do tecido hepático, estas atividades podem ser distribuídas da seguinte maneira:

- I, a - entre pH=6,0 até pH=6,5
- I, b - entre pH=6,8 até pH=7,5
- II - entre pH=7,5 até pH=8,5
- III, a - entre pH=8,5 até pH=9,2
- III, b - entre pH=9,2 até pH=10,2
- IV - entre pH=11,0 até pH=11,7

- b)- A pirofosfatase tipo III,a , com máximo de atividade em 8,8 , não se encontra em nenhuma fração hepática, e está presente, no caso do pâncreas, nas frações de mitocôndrias, microsomas e no sobrenadante citoplasmático . Não se encontra na fração nuclear.
- c)- A pirofosfatase do tipo IV , presente no caso do fígado na fração mitocondrial (e provavelmente na nuclear) , não foi detectada em nenhuma fração pancreática, a não ser, de maneira relativamente tênue, na fração mitocondrial.
- d)- A fração I,a não fôra destacada na discussão comparativa das frações hepáticas, embora existisse uma atividade detectável com ótimo em pH=6,4 , tanto no núcleo como no sobrenadante citoplasmático. No caso do pâncreas, novamente surgiu uma atividade desta ordem na fra-

ção citoplasmática, com relativa constância.

e)- Quanto à presença de dois máximos em torno de pH=8 , na fração nuclear, resta para ser esclarecido se pertencem a uma mesma enzima ou correspondem a duas entidades enzimáticas diferentes.

f)- Finalmente, a curva de pH obtida com o homogeneizado total representa, em suas zonas de atividade bem como em seus máximos, relativamente bem a soma das curvas de pH das frações sub-celulares.

7. Estudo da fração de "núcleos pancreáticos".

a)- Efeito da variação de concentração de substrato.

A esquematização desta série de experiências, bem como das demais que se seguem nos sub-ítens seguintes, foi semelhante à da adotada - para os ensaios correspondentes das frações enzimáticas e não repetidas aqui. Os pHs que foram examinados são os 7,2 , 7,8 , 8,2 e 9,6 . Em vez de usar 0,1 ml de material nuclear, foram sempre empregados 0,2 ml, aumentando desta forma o volume total por 0,1 ml .

Os resultados da variação da concentração de substrato em relação à fração de núcleos pancreáticos se encontram representados no

gráfico 26 (cobaia albina, sexo feminino, pêso de 525 g).

Em todos os 4 pHs a atividade máxima foi atingida em $3,3 \cdot 10^{-3} M$, de substrato, e em concentrações duplas a estas já se apresentava em todos os casos, acentuada inibição. Estes dados são semelhantes aos observados com o material hepático. A inibição será abordada no próximo subitem.

As curvas obtidas permitem um cálculo aproximado, provisório, das constantes de Michaelis correspondentes a cada um dos pHs examinados. Os resultados se encontram condensados no gráfico 27, através dos diagramas de reciprocidade dupla conforme Lineweaver-Burk, e podem ser tabulados da seguinte forma:

pH ensaiado	7,2	7,8	8,2	9,6
1/absorvência máxima-(1/V)	0,25	0,2	0,38	0,83
Absorvência máxima -(V) (nas cond.experimentais)	4,0	5,0	2,63	1,20
(1/Km.). 10^3 (em M^{-1})	0,87	0,30	0,95	0,47
Km (em $10^{-3} M$)	1,15	3,33	1,05	2,12

O resultado por cálculo será o seguinte (ver tabela à pag.99).

Embora estes valores não sejam definitivos, pode admitir-se que os Km das atividades em pH = 7,2 e 8,2 estão em torno de $1 \cdot 10^{-3} M$, em pH=7,8 em torno de $3,5 \cdot 10^{-3} M$, e em pH=9,6 em torno de $10^{-3} M$. Estas concentrações tão diferentes sugerem que a atividade medida em pH=7,8 é dis

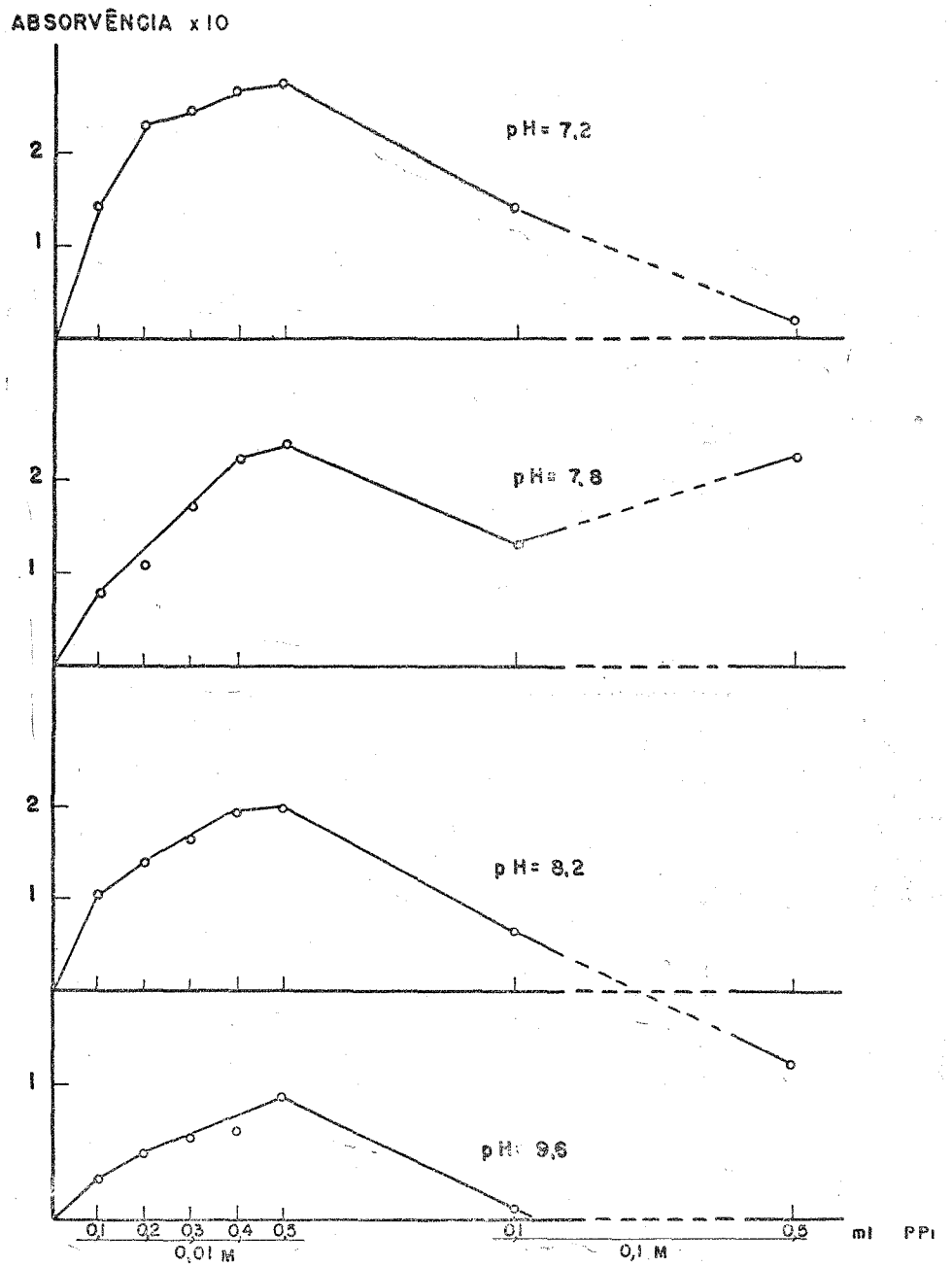


Gráfico 26: Fração de núcleos pancreáticos.

— Efeito da variação de concentração de substrato.

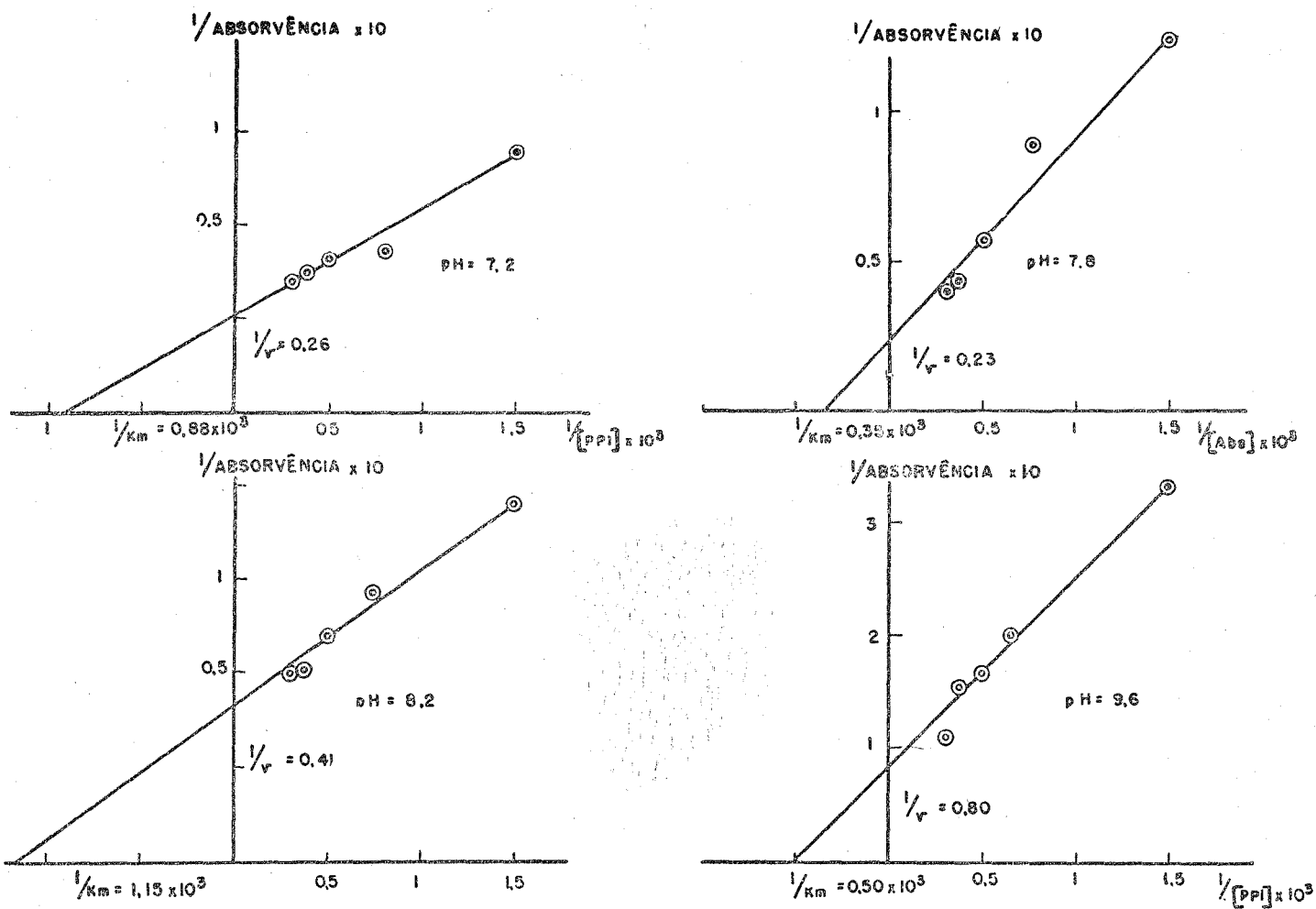


Gráfico 27: Fração de núcleos pancreáticos.

— Determinação gráfica de Km.

pH = 7,2

$[PPI] \cdot 10^{-3} M$	$1/[PPI] \cdot 10^3$	Abs. $\cdot 10$	$1/Abs. \cdot 10$	K_m
0,67	1,50	1,45	0,69	
1,33	0,75	2,30	0,43	
2,00	0,50	2,45	0,41	$1,04 \cdot 10^{-3} M$
2,67	0,38	2,65	0,37	$1,14 \cdot 10^{-3} M$
3,33	0,30	2,75	0,36	$0,99 \cdot 10^{-3} M$

pH = 7,8

$K_m = 1,05 \cdot 10^{-3} M$

0,67	1,50	0,80	1,25	
1,33	0,75	1,10	0,91	
2,00	0,50	1,75	0,57	$2,96 \cdot 10^{-3} M$
2,67	0,38	2,25	0,44	$4,38 \cdot 10^{-3} M$
3,33	0,30	2,40	0,41	$3,50 \cdot 10^{-3} M$

pH = 8,2

$K_m = 3,61 \cdot 10^{-3} M$

0,67	1,50	1,05	0,95	
1,33	0,75	1,40	0,71	$0,68 \cdot 10^{-3} M$
2,00	0,50	1,65	0,60	$0,82 \cdot 10^{-3} M$
2,67	0,38	1,95	0,51	$1,09 \cdot 10^{-3} M$
3,33	0,30	2,00	0,50	$0,94 \cdot 10^{-3} M$

pH = 9,6

$K_m = 0,88 \cdot 10^{-3} M$

0,67	1,50	0,30	3,33	
1,33	0,75	0,50	2,00	$2,64 \cdot 10^{-3} M$
2,00	0,50	0,60	1,66	$2,02 \cdot 10^{-3} M$
2,67	0,38	0,65	1,53	$1,74 \cdot 10^{-3} M$
3,33	0,30	0,90	1,11	$1,33 \cdot 10^{-3} M$

$K_m = 2,43 \cdot 10^{-3} M$

tinta das duas outras atividades vizinhas (7,2 e 8,2), e que na realidade existem pelo menos quatro pirofosfatases inorgânicas diferentes na fração nuclear.

De um modo geral, as concentrações de substrato em que a velocidade da reação se torna a metade em relação à velocidade máxima, são da ordem de 10^{-3} M, como no caso anterior e no de enzimas hidrolíticas genêricamente.

b)- Efeito inibitório do excesso de substrato.

Os dados obtidos neste grupo de experiências se encontram representados no gráfico 28 (cobaia albina, sexo feminino, de 455 g de pêso).

Tabulando êstes resultados:

pH ensaiado	7,2	7,8	8,2	9,6
Atividade máxima (em 10^{-3} M) -	4,0	2,6	3,3	1,3
Grau de inibição (a $14 \cdot 10^{-3}$ M) -	53%	90%	90%	100%
Inibição máxima- (em 10^{-3} M)	20	20	20	6,6

A atividade máxima foi atingida nos diversos pHs, em concentrações diferentes, o que - vem sugerir que provàvelmente trata-se também de quatro entidades enzimáticas diferentes. A inibi--ção máxima, que no caso presente atingiu sempre o nível de 100% , diferiu neste sentido , do que foi observado com o preparado hepático. Quanto ao

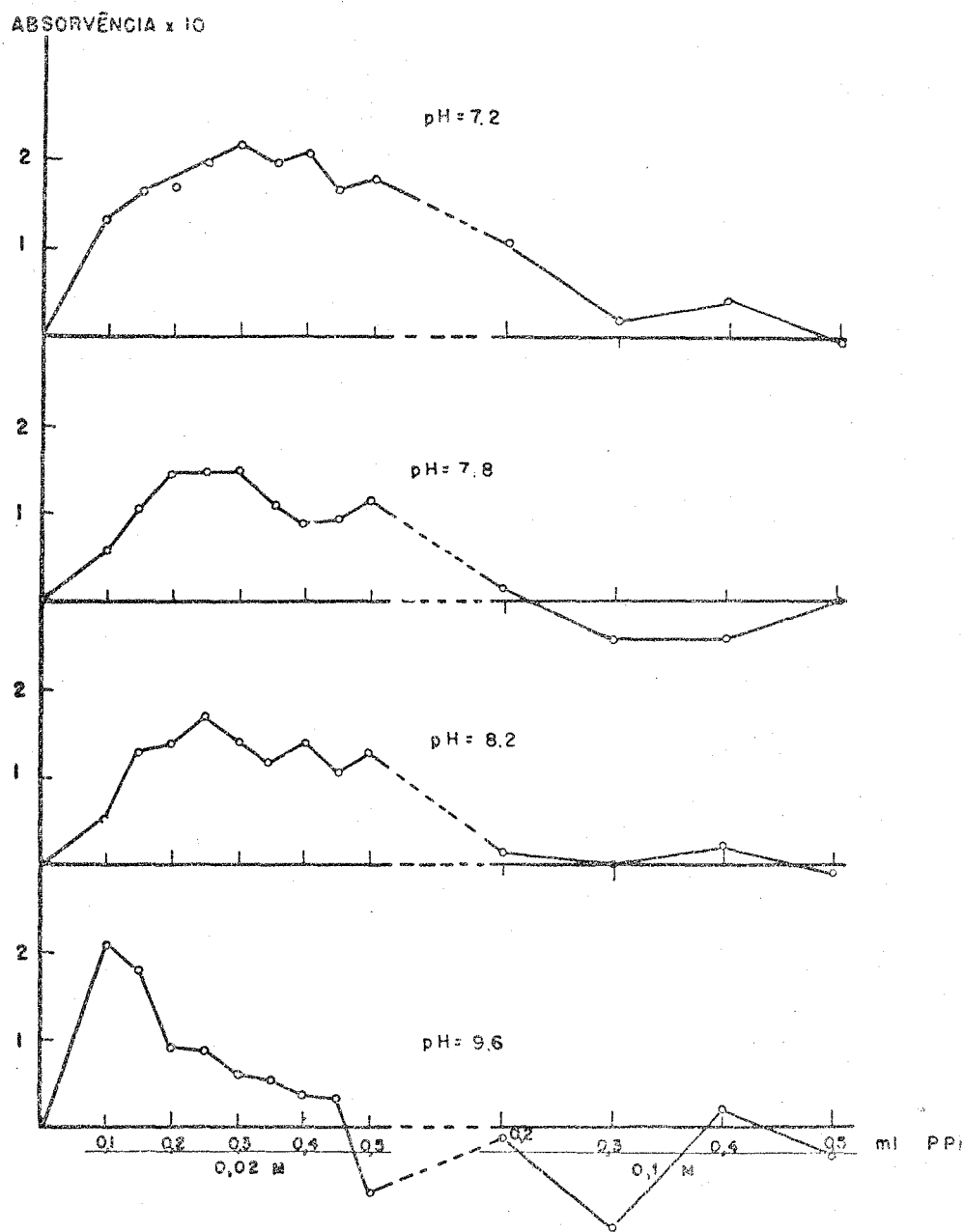


Gráfico 28: Fração de núcleos pancreáticos.

— Efeito inibitório de excesso de substrato.

nível de concentração de substrato para obter inibição máxima, a situação aqui é relativamente semelhante ao que se observou com os núcleos obtidos de fígado.

Bem mais acentuado foi, porém, como é ilustrado pelo gráfico 28, o fato de a hidrólise química do pirofosfato, a concentrações elevadas, ser menor em presença do preparado nuclear, protéico, do que na ausência deste (ensaio em branco). Tal pode ser observado em vários tubos no pH 9,6 e 7,8. Sem procurar interpretar esta observação, fica a mesma registrada.

c)- Efeito da variação de concentração do ion Mg^{++}

A execução desta série de experiências permitiu obter o gráfico 29 (cobaia albina, sexo feminino, de 375 g de peso).

A respeito da atividade enzimática face à concentração do ion Mg^{++} , não foi nestas experiências muito regular, sendo, porém, estes ensaios suficientes para ilustrar o fato de a mesma depender quantitativamente desta concentração.

Para examinar um eventual efeito inibitório de excesso de ion Mg^{++} , foi feito um outro grupo de incubações, representadas pelo gráfico 30 (cobaia albina, sexo feminino, peso de 600 g),

Estas curvas não apresentam diferenças essenciais entre si e são também semelhantes às obtidas com a fração nuclear hepática. Novamente, elevadas concentrações de ions Mg^{++} , não conseguiram inibir, de maneira completa, a atividade enzimática em foco, cabendo então as mesmas con

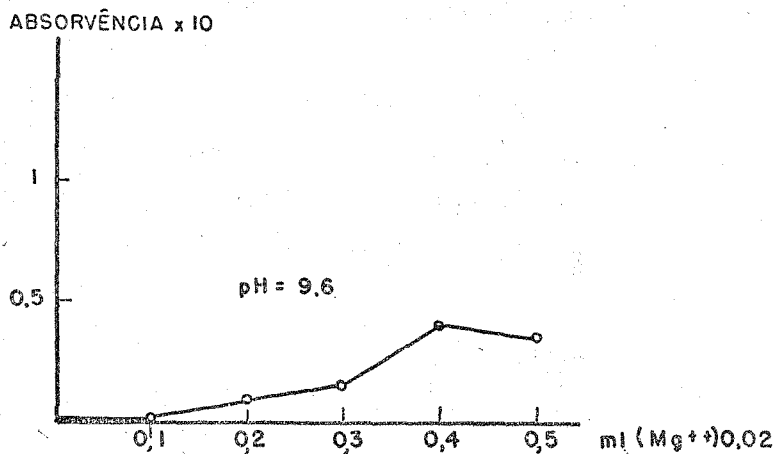
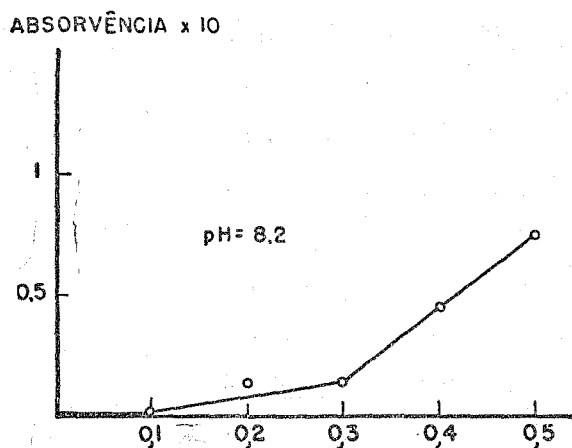
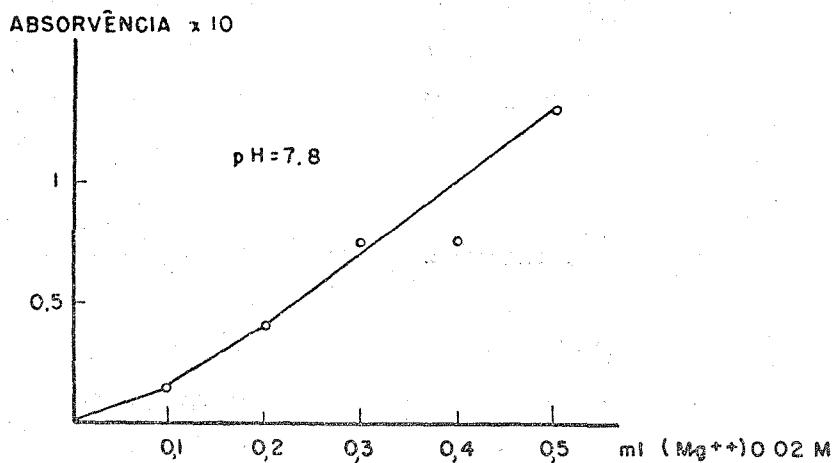
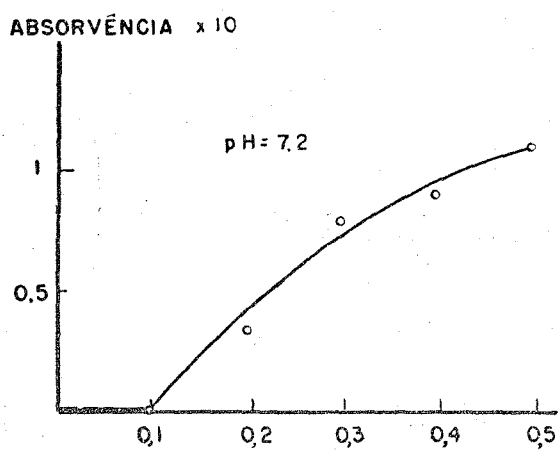


Gráfico 29: Fração de núcleos pancreáticos.

— Efeito da variação de concentração do ion magnésio.

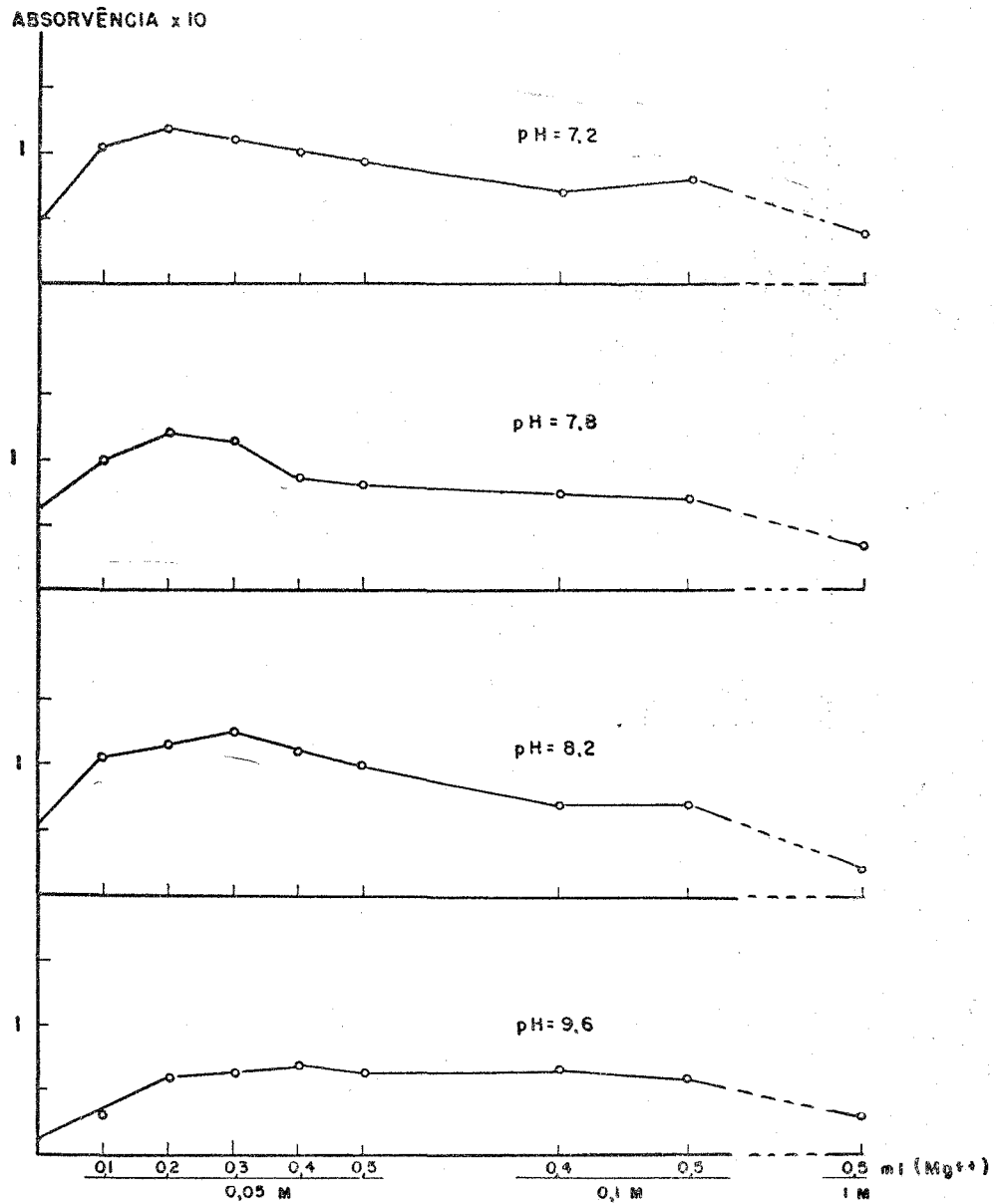


Gráfico 30: Fração de núcleos pancreáticos.

— Efeito inibitório de excesso do ion magnésio.

siderações já expostas na discussão do mesmo estudo com material hepático. Resumindo, as concentrações com efeito máximo são as seguintes:

pH ensaiado	7,2	7,8	8,2	9,6
Concentrações de Mg^{++} (em 10^{-3} M)	6,6	6,6	9,9	13,2
Grau de inibição (a 0,33 M)	67%	67%	84%	57%

d)- Efeito de outros ions sôbre a atividade pirofosfatásica.

Este conjunto de experiências, executadas para os 4 pHs em foco, demonstrou resultados análogos aos obtidos com a fração hepática, e se encontram esquematizados no gráfico 31. Os efeitos de inibição dos ions metálicos, comparados com a ativação obtida com ion Mg^{++} isolado, não foram tão acentuados como na preparação nuclear obtida de fígado. Também pode ser observado que a incubação feita sem adição de qualquer ion metálico apresentou uma atividade relativa apreciável. Isto provavelmente vem indicar que existiu suficiente quantidade "endógena" de ion Mg^{++} nas preparações usadas.

O EDTA e o formaldeído apresentaram inibições comparáveis às observadas nos ensaios correspondentes do sub-capítulo anterior.

No gráfico 32, está representado o efeito inibitório do ion Ca^{++} a várias concen

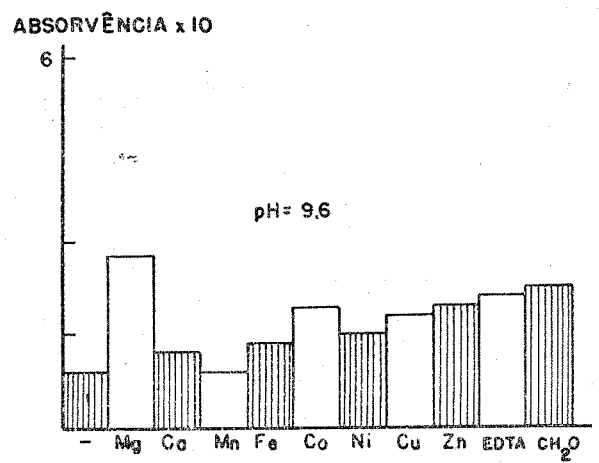
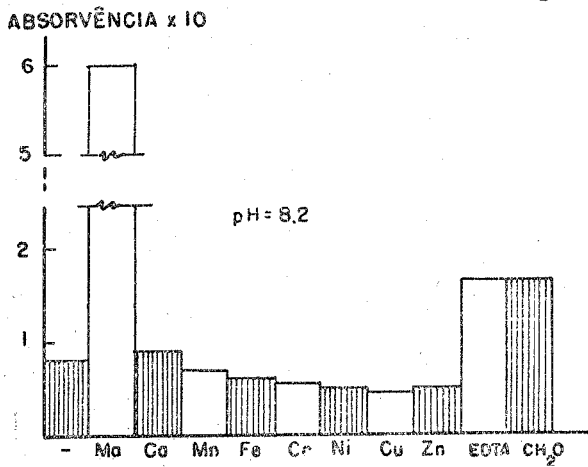
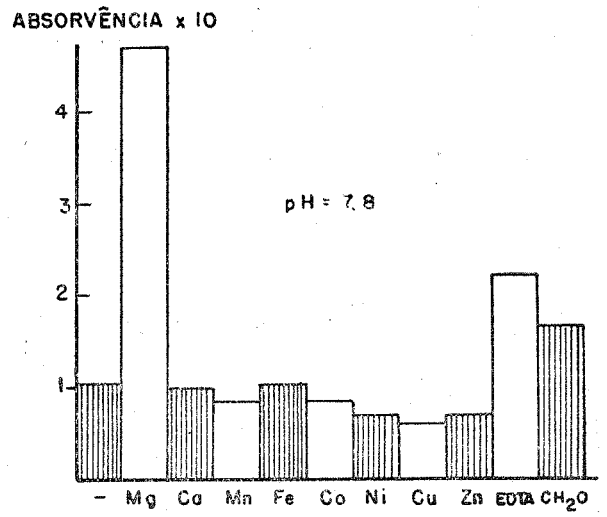
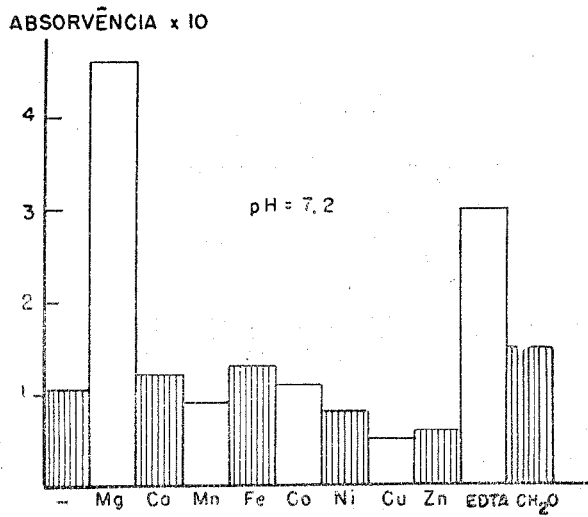
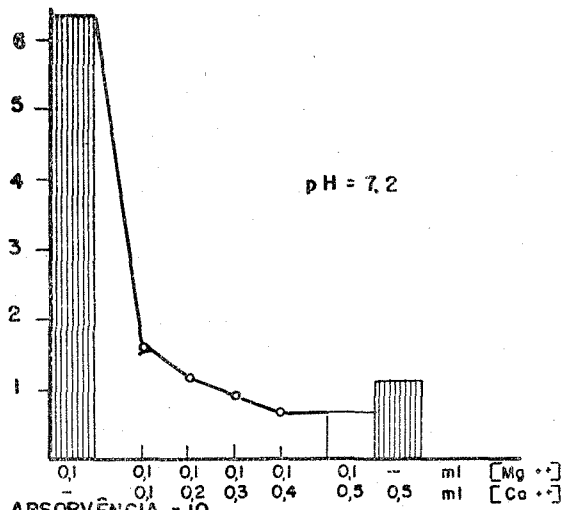


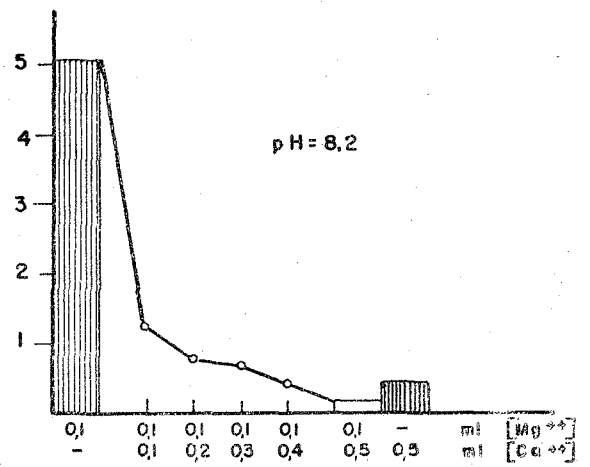
Gráfico 31: Fração de núcleos pancreáticos.

— Efeito comparativo de inibidores.

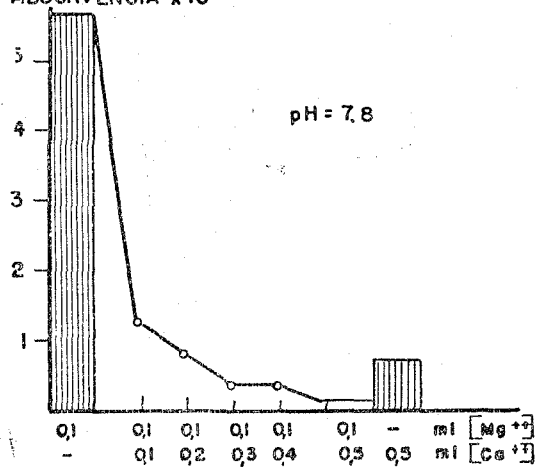
ABSORVÊNCIA x 10



ABSORVÊNCIA x 10



ABSORVÊNCIA x 10



ABSORVÊNCIA x 10

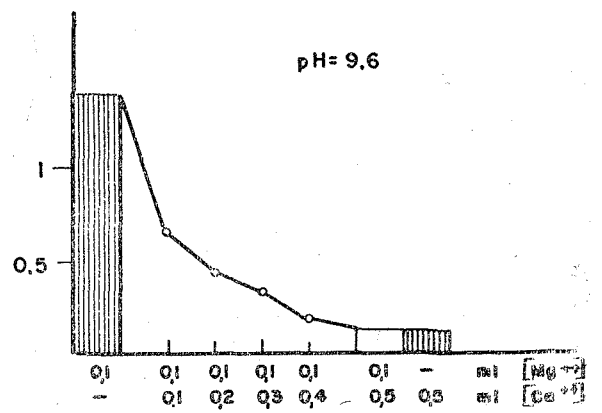


Gráfico 32: Fração de núcleos pancreáticos.

— Efeito inibitório do ion cálcio.

trações. Os resultados são qualitativamente identificáveis com os obtidos com o tecido hepático. Também aqui, o ion Ca^{++} não mostrou nenhum efeito ativador sobre a atividade enzimática .

Outros inibidores foram estudados, conforme o gráfico 33 . Novamente o p-hidroxi-mercuri-benzoato inibiu enérgicamente a ação enzimática, agora em todos os quatro pHs testados, indicando a participação essencial no mecanismo da hidrólise, de grupos sulfidrila livres. O ion cianeto também indicou nestas experiências uma leve acen-- tuação da atividade pirofosfatásica, comparando com incubações habituais, das quais se omitiu êste ion. A curva do ion fluoreto apresenta uma inibição acentuada, em níveis semelhantes aos observados com a preparação hepática, com a diferença de que a concentrações mais elevada foi possível obter i nibição completa, ou quasi completa da enzima (pHs= 9,6 e 8,2) .

e)- Efeito da variação do tempo de incubação.

O estudo experimental dêste efeito se encontra condensado no gráfico 34 , (cobaia albina, sexo feminino, pêso de 450 g).

Tôdas as curvas dêste gráfico sugerem que a velocidade da reação aumentou no transcorrer do tempo.

É uma observação interessante, que permitiria um estudo cinético mais detalhado. Como interpretação poder-se-ia propor, por exemplo, que a estrutura dos núcleos sofreria modificação estrutural, mesmo decomposição, durante uma incubação mais prolongada, permitindo, desta forma, um aces

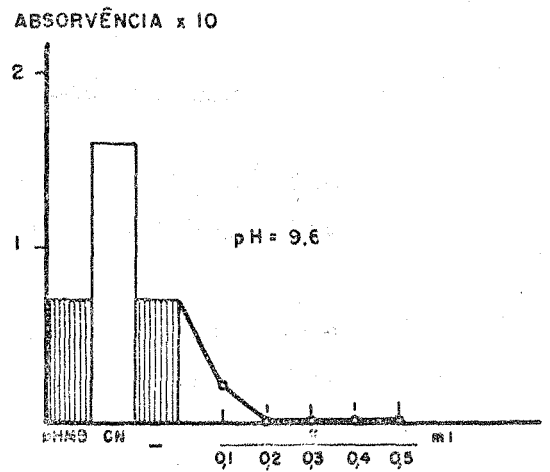
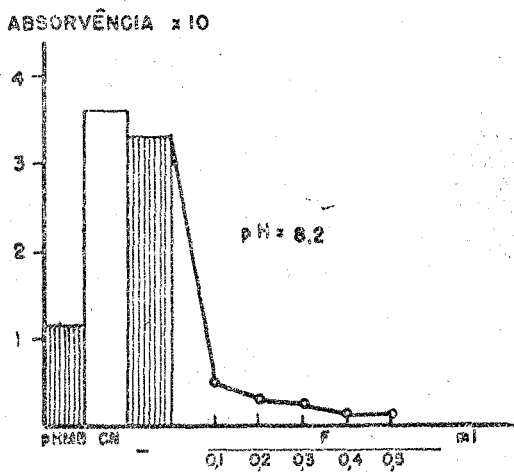
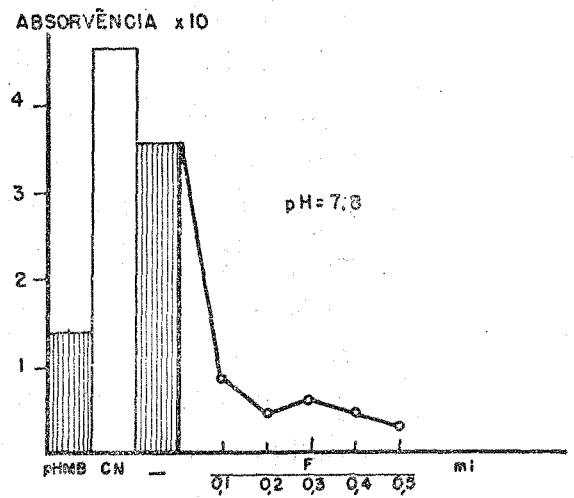
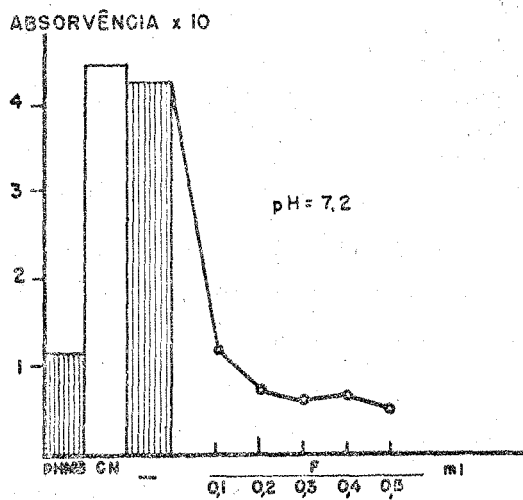
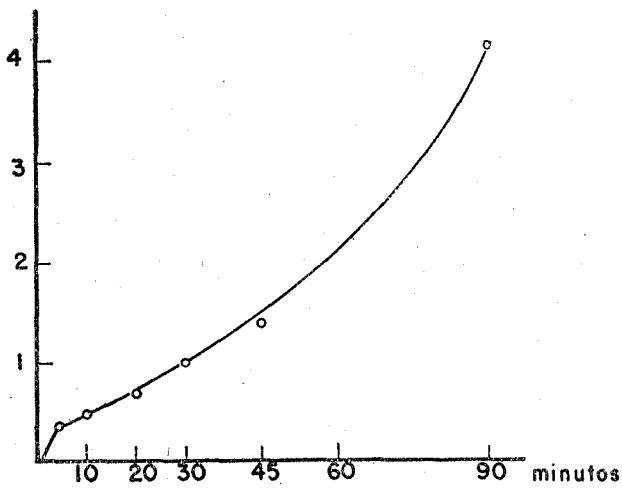


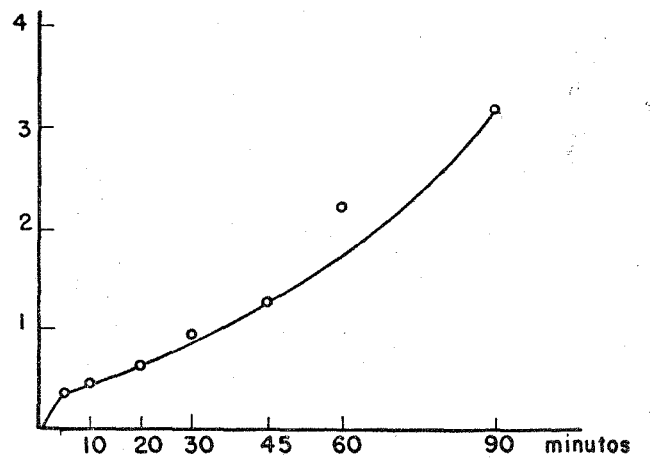
Gráfico 33: Fração de núcleos pancreáticos.

— Efeito de inibidores. Curva do ion fluoreto.

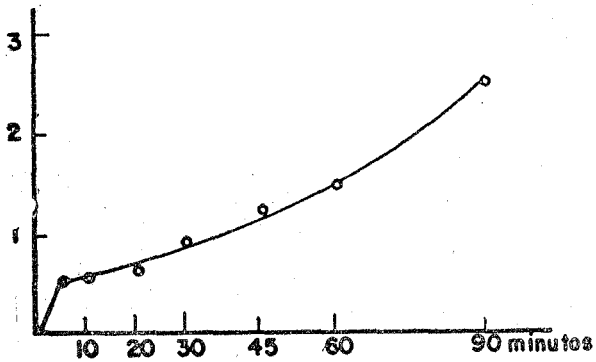
ABSORVÊNCIA x 10



ABSORVÊNCIA x 10



ABSORVÊNCIA x 10



ABSORVÊNCIA x 10

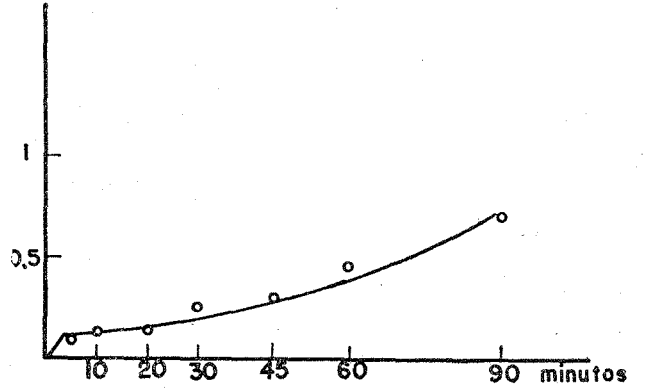


Gráfico 34: Fração de núcleos pancreáticos. — Curva de tempo.

so mais direto da enzima ao substrato.

f)- Efeito da variação de temperatura de incubação e de pre-aquecimento da preparação nuclear.

O gráfico 35 contém os resultados das experiências feitas sobre este aspecto. (co--baia albina, sexo feminino, peso de 500 g).

Os mesmos não diferem substancialmente dos obtidos com a fração nuclear hepática, e os comentários expendidos naquela ocasião também se aplicam ao presente caso.

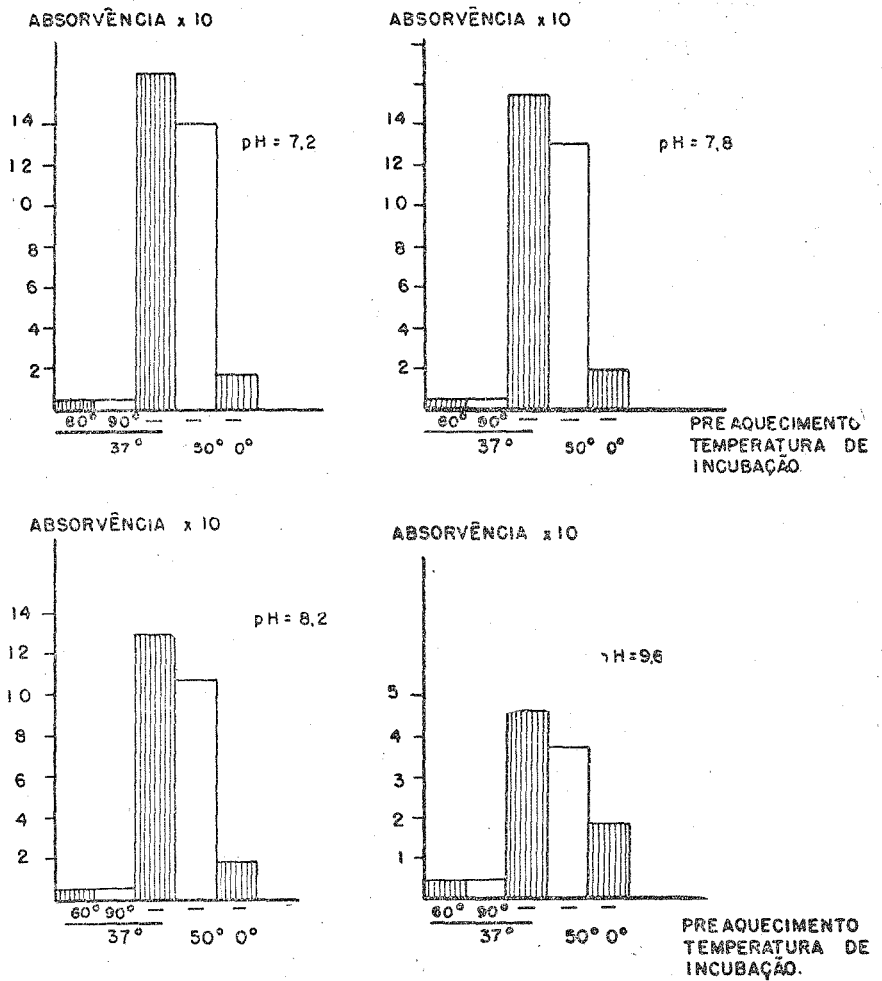


Gráfico 35: Fração de núcleos pancreáticos. — Efeito da temperatura.

C A P Í T U L O I V : CONCLUSÃO E SUMÁRIO

Os diversos grupos de experiências foram discutidos parceladamente em dada um de seus itens correspondentes. Torna-se agora necessário a pontar alguns aspectos de ordem geral, bem como as sinalar resultados mais significativos.

A única pirofosfatase inorgânica de origem hepática estudada com relativo detalhe, é a denominada "pirofosfatase inorgânica neutra", com pH ótimo em 7,8 (169). Esta foi extraída de um homogeneizado total de tecido hepático (rato), sem particularização de alguma fração subcelular.

Da mesma forma, a atividade pirofosfatásica no tecido pancreático foi observada de maneira muito superficial.

1)- O trabalho experimental que o autor aqui apresenta, consiste, primeiramente, na descoberta de um determinado número de novas enzimas de atividade pirofosfatásica inorgânica, as quais foram denominadas, para efeito de sistematização, da seguinte maneira:

- no tecido hepático: tipo I, II, III e IV, dos quais o tipo II provavelmente corresponde à "pirofosfatase neutra".
- no tecido pancreático: além destes, - dois tipos acessórios, denominados I, a e III, a,

sendo particularmente a última, um componente específico deste tecido.

2)- Em segundo lugar, o autor determinou a distribuição destas diferentes enzimas através de frações sub-celulares, obtendo perfis enzimáticos característicos para cada uma destas frações.

No fígado, os tipos I e II são componentes constantes de todas as frações sub-celulares. O tipo III está presente particularmente nas frações microsomiais e sobrenadante citoplasmático. O tipo IV, de atividade proporcional muito reduzida, aparece, em compensação, exclusivamente nas frações mitocondrial e nuclear.

No pâncreas, esta distribuição encontra um paralelo aproximado. Os tipos I,b e II são encontrados em todas as frações sub-celulares. O tipo III,b, embora fosse assinalado também nas frações nuclear e mitocondrial, é achado especialmente nas outras duas frações. O tipo IV, é um componente exclusivo da fração mitocondrial.

Porém, ainda neste tecido, acessoriamente há o tipo III,a, que não pode ser encontrado na fração nuclear, porém existe nas demais. Um último tipo, I,a, se encontra no tecido pancreático na fração do sobrenadante citoplasmático.

3)- O autor estudou ainda, com mais detalhes, a primeira das frações sub-celulares, a nuclear, tanto no tecido hepático como no pancreático.

a)- No primeiro caso foi possível demonstrar que

as atividades tipo I , II , III e IV , correspondem a enzimas individuais. A constante de Michaelis aproximada foi obtida nos três primeiros tipos, demonstrando ser respectivamente da ordem de 3.10^{-3} M , 2.10^{-3} M e $0,6.10^{-3}$ M .

O excesso de substrato demonstrou forte efeito de inibição enzimática, chegando mesmo a anular a atividade em alguns casos. Embora não fosse possível apresentar interpretação do mecanismo desta inibição, os resultados não se coadunam com as duas hipóteses vigentes, exigindo, no futuro, um exame mais detalhado do problema.

A dependência das 4 enzimas em relação ao ion Mg^{++} ficou amplamente demonstrada, devendo assinalar-se que somente grande excesso desta ion pode causar alguma inibição de sua atividade. Um grande grupo de ions metálicos (Ca^{++} , Mn^{++} , Fe^{++} , Co^{++} , Ni^{++} , Cu^{++} e Zn^{++}) mostraram ser aparentemente antagonistas desta ação ativadora do ion Mg^{++} . Todavia, o efeito dos mesmos, com exceção do primeiro, foi atribuído pelo autor, ao fato de seus sais pirofosfatos serem bastante insolúveis, e por conseguinte, diminuírem ou anularem a concentração efetiva do substrato. O efeito do ion Ca^{++} foi examinado com mais detalhes, ficando evidente que se trata neste caso, de uma inibição direta. Este ion, por si só não é ativador das enzimas. O EDTA, sem dúvida, possui acentuada ação inibidora das atividades pirofosfatásicas, em face de sua ação complexante em relação ao ion Mg^{++} . Também o formaldeído é inibidor enérgico. A inibição da atividade dos diversos tipos de pirofosfatas foi vista com alguma minúcia no caso do ion F^{-} . O para-hidroxi-mercuri-benzoato demonstrou que

a atividade enzimática dos tipos I , II e III (o IV não foi examinado) exige grupo sulfidrilá livre. O ion CN^- teve um efeito nitidamente ativa--dor, fato êste ao qual não se pôde oferecer interpretação à base dos dados disponíveis.

A curva do tempo comprovou que, na fase inicial a reação estudada, para os 4 tipos, é de primeira ordem.

Foi visto, finalmente que os 4 tipos de pirofosfatases inorgânicas nucleares se inativam facilmente com o aquecimento, mesmo a 60°C . Embora não fôsse feita curva completa de temperatura, foi possível evidenciar, que ainda a 50°C , em incubações de 45 minutos, todos os tipos apresentam atividade enzimática, sendo esta mesmo mais intensa do que a 37°C .

b)- No caso das pirofosfatases inorgânicas nucleares provenientes do tecido pancreático, análise experimental semelhante foi feita.

Os quatro tipos examinados nesta fração (I,b , II,a e b e III,b) parecem ser entidades enzimáticas diferentes. Isto é sugerido por suas respectivas constantes de Michaelis, localizadas aproximadamente em 1.10^{-3} M, $3,5.10^{-3}$ M, 1.10^{-3} M e $2,5.10^{-3}$ M .

O excesso de substrato inibiu com intensidade as quatro enzimas, podendo em todos os casos chegar a anulá-la.

O comportamento em face do ion Mg^{++} , bem como as inibições causadas pelos diversos ions metálicos foram examinados e evidenciaram ser semelhantes ao verificado com os tipos hepáti-

cos. O mesmo pôde ser provado para as inibições com EDTA, formaldeído, ion F^- , e o efeito particular do ion CN^- . Os grupos sulfidrila livres, em face da inibição pelo para-hidroxi-mercuri-benzoato, são tam bém aqui essenciais para a atividade pirofosfatásica eficiente.

As curvas de tempo destas pirofosfatases nucleares pancreáticas, embora não examinadas com mais detalhe, apresentaram uma carater exponencial, para o qual não foi possível apresentar interpretação fundamentada, experimentalmente.

Quanto ao comportamento em face da temperatura, no que concerne à inativação e condições de incubação, os quatro tipos foram semelhantes.

SUMÁRIO

O autor estudou enzimas de atividade pirofosfatásica inorgânica em dois tecidos de origem animal, hepático e pancreático. Foram individualizadas algumas novas espécies deste grupo, com características particulares. A distribuição destas enzimas nas várias frações sub-celulares dos dois tecidos, foi examinada comparativamente.

O trabalho se concentrou no estudo das enzimas pirofosfatásicas inorgânicas nucleares e descreve seu comportamento cinético em face da concentração do substrato, ativadores, inibidores, tempo de ação e inativação.

C A P Í T U L O V : Referências bibliográficas.

1. H.A.Krebs e H.L.Kornberg
- "Energy Transformations in Living Matter",
Sonderabdruck de Erg. der Phys., Biol. Chem.
und Exp. Pharm. 49 , 212 (1957).
2. E.Baldwin
- "An Introduction to Comparative Biochemistry"
1ª edição, 1949, Cambridge University Press,
p. 151.
3. DeWitt Stetten Jr.
- "Biosynthesis and Pyrophosphate".
Am. J. Med. 28, 867 (1960).
4. H.A.Krebs
- "Rate Limiting Factors in Cell respiration",
em "Regulation of Cell-metabolism - a Ciba
Foundation Symposium", editores G.E.W.Wos-
tenholme e C.M.O'Connor, 1959, J.eA.Churchill
Ltd., Londres, p.2.
5. T.Benzinger, C.Kitzinger , R.Hems e K.Burton.
- Biochem. J. 71, 400 (1959).
6. E.A.Atkinson, E.Jhonson e R.K.Morton.
- Nature 184, 1925 (1959).
7. E.A.Robbins e P.D.Boyer
- J.Biol.Chem. 224, 121 (1957).
8. A.Schuegraf, S.Ratner e R.C.Warner.
- J.Biol.Chem. 235, 3597 (1960).
9. W.A.Engelhardt e M.N.Ljubimova.
- Nature 144, 669 (1939).
10. S.P.Colowick e H.M.Kalckar.
- J.Biol.Chem. 148, 117 (1943)

11. J.R.Stern e S.Ochoa.
- J.Biol.Chem. 191, 161 (1951).
12. E.R.Stadtman.
- J.Biol.Chem. 196, 535 (1952).
13. D.R.Sanady, D.M.Gibson, P.Ayengar e L.Ouellet.
- Biochim.Biophys. Acta 13, 146 (1954).
14. T.L.Hill e M.F.Morales.
- J.Am.Chem.Soc. 73, 1656 (1951).
15. K.Burton.
- Biochem.J. 71, 388 (1959).
16. F.Lipmann.
- em "The Mechanism of Enzyme Action", edi-
tores W.D.Mc Elroy e B.Glass, 1954,
J.Hopkins Press, Baltimore, p. 599.
17. F.Lipmann.
- J.Am.Chem.Soc. 74, 2384 (1952).
18. T.C.Chou e F.Lipmann.
- J.Biol.Chem. 196, 89 (1952).
19. H.Beinert, D.E.Green, P.Hele, H.Hift, R.W.Korff
e C.V.Ramakrishnan.
- J.Biol.Chem. 203, 35 (1953).
20. F.Lipmann, M.E.Jones, S.Black e R.M.Flynn.
- J.Cell.Comp.Physiol. 41, Suppl. 1, 109 (1953).
21. M.E.Jones, F.Lipmann, H.Hilz e F.Lynen.
- J.Am.Chem.Soc. 75, 3285 (1953).
22. A.Millard e J.Bonner.
- Arch.Biochem.Biophys. 49, 343 (1954).
23. P.Hele.
- J.Biol.Chem. 206, 671 (1954).
24. M.A.Eisenberg.
- Biochim.Biophys. Acta 16, 58 (1955).
25. A.L.Lehninger e G.D.Greville.
- Biochim.Biophys. Acta 12, 188 (1953).

26. H.R.Mahler.
- Fed.Proc. 12, 694 (1953).
27. H.R.Mahler, S.J.Wakil e R.M.Bock.
- J.Biol.Chem. 204, 453 (1953).
28. W.P.Jenks.
- Fed.Proc. 12, 703 (1953).
29. C.H.Lee-Peng.
- Biochim.Biophys.Acta 22, 42 (1956).
30. A.Kornberg e W.E.Pricer Jr.
- J.Biol.Chem. 204, 329 (1953).
31. P.Berg.
- J.Amer.Chem.Soc. 77, 3163 (1955).
32. P.Berg.
- Fed.Proc. 15, 219 (1956).
33. P.Berg.
- J.Biol.Chem. 222, 991 (1956).
34. P.Berg.
- J.Biol.Chem. 222, 1015 (1956).
35. P.Berg.
- J.Biol.Chem. 222, 1025 (1956).
36. D.Schachter e J.V.Taggart.
- J.Biol.Chem. 208, 263 (1954).
37. F.Lipmann.
- cit. por A.Kornberg, Adv.Enzymology 18,
191 (1957).
38. W.H.Elliott.
- Biochem.J. 62, 427 (1956).
39. W.H.Elliott.
- Biochem.J. 62, 433 (1956).
40. W.H.Elliott.
- Biochem.J. 65, 315 (1957).
41. K.M.Jones.
- Thesis.University of Oxford,England. (1957)
Comunicação pessoal.

42. M.Miranda.
- Informação pessoal. (1960).
43. M.B.Hoagland.
- Biochim.Biophys.Acta 16, 288 (1955).
44. J.A.DeMoss e G.D.Novelli.
- Biochim.Biophys.Acta 18, 592 (1955).
45. M.B.Hoagland, E.B.Keller e P.C.Zamecnik.
- J.Biol.Chem. 218, 345 (1956).
46. F.Lipmann.
- em "Currents in Biochemical Research-1954",
editor D.E.Green, Interscience Publ., 1956,
p. 241.
47. F.Lipmann, W.C.Huelsmann, G.Hartmann, H.G.Boman
e G.Acs.
- "Amino Acid Activation and Protein Synthesis",
no "Symposium on Enzyme Reaction Mechanism",
abril, 1959, Oak Ridge National
Laboratory, Estados Unidos, p. 75.
48. E.B.Keller e P.C.Zamecnik.
- J.Biol.Chem. 221, 45 (1956).
- 48a. J.Leahy, E.Glassman e R.S.Schweet.
- J.Biol.Chem. 235, 3209 (1960).
49. G.L.Cantoni.
- J.Biol.Chem. 204, 403 (1953).
50. G.L.Cantoni e J.Durrel.
- Fed.Proc. 15, 229 (1956).
51. G.L.Cantoni.
- "Proceedings, 3rd. International Congress of
Biochemistry", Bruxelas 1955, editor C. Lié
becq, Academic Press Inc., 1956, p. 233.
52. G.L.Cantoni e J.Durrel.
- J.Biol.Chem. 225, 1033 (1957).
53. R.S.Schweet.
- Fed.Proc. 16, 244 (1957).

54. R.D.Coole, J.Coote e T.S.Work.
- Nature 179, 199 (1957).
55. E.W.Davis, V.V.Koningsberger e F.Lipmann..
- Arch.Biochem.Biophys. 65, 21 (1956).
56. H.A.Krebs e K.Henseleit.
- Z.Physiol.Chemie 210, 33 (1932).
57. S.Ratner e B.Petrak.
- J.Biol.Chem. 200, 175 (1953).
58. S.Ratner.
- Adv.Enzymology 15, 319 (1954).
59. S.Ratner.
- Em "Methods in Enzymology - vol II", edito
res S.P.Colowick e N.O.Kaplan, Academic
Press Inc., N.York, 1955, p. 356.
60. S.Ratner e B.Petrak.
- Arch.Biochem.Biophys. 65, 582 (1956).
61. A.Kornberg.
- Adv.Enzymology 18, 191 (1957).
62. R.Caputto, L.F.Leloir, G.F.Cardini e A.C.Paladi
ni.
- J.Biol.Chem. 184, 333 (1950).
63. H.M.Kalckar,
- Biochim.Biophys,Acta 12, 250 (1953).
64. A.Munch-Petersen, H.M.Kalckar, E.Cutolo e E.E.
B.Smith.
- Nature 172, 1036 (1953).
65. E.E.B.Smith e G.T.Mills.
- Biochim.Biophys,Acta 18, 152 (1955).
66. A.Munch-Petersen.
- Acta Chem,Scand. 9, 1523 (1955).
67. V.Ginsburg, E.F.Neufeld e W.Z.Hassid.
- Proc.Nat.Acad.Sci., U.S. 42, 333 (1956).
68. A.Munch-Petersen.
- Arch.Biochem.Biophys. 55, 592 (1955).

69. J.L.Strominger, H.M.Kalckar, J.Axelrod e E.S. Maxwell.
- J.Amer.Chem.Soc. 76, 6411 (1954).
70. G.J.Dutton e I.D.Storey.
- Proc.Biochem.Soc., Biochem.J. 53, XXXVII, (1953).
71. I.D.E.Storey e G.J. Dutton.
- como ref. 51, p. 162.
72. R.Schmid.
- Science 124, 76 (1956).
73. P.G.Cole e G.H.Lathe.
- J.Am.Med.Science 24, 116 (1958).
74. L.F.Leloir.
- Arch.Biochem,Biophys. 33, 186 (1951).
75. L.F.Leloir e C.E.Cardini.
- J.Amer.Chem.Soc. 75, 6084 (1953).
76. L.F.Leloir e C.E.Cardini.
- J.Biol.Chem. 214, 157 (1955).
77. J.Mendicino.
- J.Biol.Chem. 235, 3347 (1960).
78. L.F.Leloir, e C.E.Cardini
- J.Amer.Chem.Soc. 75, 5445 (1953).
79. L.Glaser.
- Biochim.Biophys.Acta. 25, 436 (1957).
80. C.E.Cardini e T.Yamaha.
- Nature 182, 1446 (1958).
81. T.Yamaha e C.E.Cardini.
- Arch.Biochem,Biophys. 86, 127 (1960).
82. T.Yamaha e C.E.Cardini.
- Arch.Biochem.Biophys. 86, 133 (1960).
83. J.M.Clavarría.
- J.Biol.Chem. 235, 3058 (1960).
84. L.F.Leloir e C.E.Cardini.
- J.Amer.Chem.Soc. 79, 6340 (1957).

85. C.Villar-Palasi e J.Larner.
- Biochim.Biophys.Acta 30, 449 (1958).
86. L.F.Leloir, J.M.Olavarria, S.H.Goldenberg e H. Carminatti.
- Arch.Biochim.Biophys. 81, 508 (1959).
87. P.W.Robbins, R.R.Traut e F.Lipmann.
- Proc.Nat.Acad.Sci., U.S. 45, 6 (1959).
88. R.Hank e D.H.Brown .
- Biochim.Biophys.Acta 33, 556 (1959).
89. W.F.H.M.Mommaerts, B.Illingworth, C.M.Pearson, R.J.Guillory e K.Seraydarian.
- Proc.Nat.Acad.Sci., U.S. 45, 791 (1959).
90. L.F.Leloir e S.H.Goldenberg.
- J.Biol.Chem. 235, 919 (1960).
91. R.B.Hurlbert e P.Reichard.
- Acta Chem.Scand. 9, 251 (1955).
92. A.Kornberg, I.Lieberman e E.S.Simms.
- J.Amer.Chem.Soc. 76, 2027 (1954).
93. A.Kornberg, I.Liebermann e E.S.Simms..
- J.Amer.Chem.Soc. 76, 2844 (1954).
94. C.N.Remy, W.T.Remy e J.H.Buchanan,
- J.Biol.Chem. 217, 885 (1955).
95. A.Kornberg, I.Lieberman e E.S.Simms.
- J.Biol.Chem. 215, 417 (1955).
96. L.N.Lukens e K.A.Herrington.
- Biochim.Biophys.Acta 24, 432 (1957).
97. D.A.Goldthwait, G.R.Greenberg e R.A.Peabody.
- Biochim.Biophys.Acta 18, 148 (1955).
98. D.A.Goldthwait, G.R.Greenberg e R.A.Peabody.
- J.Biol.Chem. 221, 569 (1956).
99. S.C.Hartman, B.Levenberg e J.M.Buchanan.
- J.Biol.Chem. 221, 1057 (1956).
100. G.R.Greenberg.
- J.Biol.Chem. 190, 611 (1951).

101. G.R.Greenberg.
- Fed.Proc. 12, 651 (1953).
102. D.A.Goldthwait e R.N.Peabody.
- Fed. Proc. 13, 218 (1954).
103. G.R.Greenberg.
- J.Biol.Chem. 219, 423. (1956).
104. J.M.Buchanan e D.W.Wilson.
- Fed. Proc. 12, 646 (1953).
105. B.Levenberg e J.M.Buchanan.
- J.Amer.Chem.Soc. 78, 504 (1956).
106. B.Levenberg e I.Melnik.
- Fed.Proc. 15, 117 (1956).
107. L.N.Lukens e J.M.Buchanan.
- Fed.Proc. 15, 117 (1956).
108. F.Ferreira.
- Comunicação pessoal. (1960).
109. I.Lieberman, A.Kornberg e E.S.Simms.
- J.Biol.Chem. 215, 403. (1955).
110. I.Crawford, A.Kornberg e E.S.Simms.
- J.Biol.Chem. 226, 1093 (1957).
111. A.Kornberg, I.R.Lehman e E.S.Simms.
- Fed. Proc. 15, 291 (1956)
112. A.Kornberg, I.R.Lehman, M.J.Bessman e E.S.Simms
- Biochim.Biophys.Acta. 21, 197 (1956).
113. M.J.Bessman, I.R.Lehman, E.S.Simms e A.Kornberg
- Fed.Proc. 16, 153 (1957).
114. I.R.Lehman, M.J.Bessman, E.S.Simms e A.Kornberg.
- J.Biol.Chem. 233, 163 (1958).
115. H.S.Moyed e B.Magasanik.
- J.Biol.Chem. 226, 351 (1957).
116. J.Preiss e P.Handler.
- J.Biol.Chem. 225, 759 (1957).

117. A.Kornberg,
- J.Biol.Chem. 176, 1475 (1948).
118. A.Kornberg,
- Fed.Proc. 8, 215 (1949).
119. A.Kornberg,
- J.Biol.Chem. 182, 779 (1950).
120. A.Kornberg e W.E.Pricer.
- J.Biol.Chem. 191, 535 (1951).
121. A.Kornberg.
- em "Phosphorus Metabolism - Vol I", editores W.D.McElroy e B.Glass, J.Hopkins Press, Baltimore, 1951, p. 392.
122. D.E.Green et al.
- cf. H.M.Kalckar em "The Enzymes - Vol II", editores J.B.Sumner e K.Myrback, Academic Press Inc., N.York, 1951, parte 1, p. 151.
123. B.Katchman, J.J.Betheil, A.I.Schepartz e D.R.Sanadi.
- Arch.Biochem.Biophys. 34, 437 (1951).
124. A.Kornberg.
- J.Biol.Chem. 182, 805 (1950).
125. J.R.Stern e A. del Campillo.
- J.Amer.Chem.Soc. 77, 1073 (1955).
126. A.W.Schrecker e A.Kornberg.
- J.Biol.Chem. 182, 795 (1950).
127. W.K.Maas.
- Reports, 3rd. Int. Congr. Biochem., Bruxelas, p. 195.
128. W.K.Maas.
- cf. F.Lipmann, na ref. 16.
129. G.D.Novelli.
- Fed.Proc. 12, 675 (1953).
130. M.B.Hoagland e G.D.Novelli.
- J.Biol.Chem. 207, 767 (1954).

131. F.Lipmann, N.O.Kaplan, G.D.Novelli e L.C.Tuttle
- J.Biol.Chem. 186, 235 (1950).
132. T.P.Wang e N.O.Kaplan.
- J.Biol.Chem. 206, 311 (1954).
133. H.Hiltz e F.Lipmann.
- Proc.Nat.Acad.Sci., U.S., 41, 880 (1955).
134. R.H.DeMeio e M.Wezerkaniuk.
- Biochim.Biophys.Acta 20, 428 (1956).
135. H.L.Segal.
- Biochim.Biophys.Acta 21, 194 (1956).
136. P.W.Robins e F.Lipmann.
- J.Amer.Chem.Soc. 78, 2652 (1956).
137. P.W.Robins e F.Lipmann.
- J.Amer.Chem.Soc. 78, 6409 (1956).
138. R.S.Bandurski, L.G.Wilson e C.L.Squires.
- J.Amer.Chem.Soc. 78, 6408 (1956).
139. R.H.DeMeio, M.Wizerkaniuk e I.Schreibman.
- J.Biol.Chem. 213, 439 (1955).
140. L.G.Wikon e G.Bandurski.
- Arch.Biochem.Biophys. 62, 503 (1956).
141. A.A.Green e W.D.McElroy.
- Biochim.Biophys.Acta 20, 170 (1956).
142. W.D. McElroy e A.Green.
- Arch.Biochem.Biophys. 64, 257 (1956).
143. L.A.Heppel e R.J.Hilmoe.
- Fed.Proc. 10, 196 (1951).
144. J.Roche, Nguyen-van-Thoai e E.Danzas.
- Bull.Soc.Chim.Biol. 26, 1138 (1944).
145. J.Roche, Nguyen-van-Thoai e E.Danzas.
- Bull.Soc.Chim.Biol. 27, 401 (1945).
146. J.Roche, Nguyen-van-Thoai e E.Danzas.
- C.R.Acad.Sci., Paris, 220, 834 (1945).

147. J.Roche.
- em "The Enzymes - Vol I", parte 1, editores J.B.Sumner e K.Myrbeck, Academic Press Inc., N.York, 1950, p. 482.
148. H.Weil-Malherbe.
- Biochem.J. 33, 1997 (1939).
149. F.Leuthardt e H.Nielsen.
- Helv.Chim.Acta 35, 1196 (1952).
150. E.P.Steyn-Parvé.
- Biochim.Biophys.Acta 8, 310 (1952).
151. O.Meyerhof e P.Oesper.
- Arch.Biochem.Biophys. 38, 237 (1952).
152. P.Ohlmeyer e R.Shatas.
- Arch.Biochem.Biophys. 36, 411 (1952).
153. K.Burton.
- em apêndice, na ref. 1.
154. T.Dick.
- Tese Faculdade de Medicina de Porto Alegre, U.R.G.S., 1958.
155. L.B.Pett e A.M.Wynne.
- Biochem.J. 32, 563 (1938).
156. D.W.Brown, W.Militzer e C.E.Giorgi.
- Arch.Biochem.Biophys. 70, 248 (1957).
157. H.Luers, B.N.v.Zychlinski e K.Bengston,
- Wochscr.Brau. 48, 519, 529 (1933).
cf. citação de G.Schmith em "Phosphorus Metabolism, Vol. I", semelhante a referência 121.
158. E.Bauer.
- Naturwissenschaften, 23, 886 (1955) cf. ref. 157.
159. P.Fleury e J.Courtois.
- Enzymologia 1, 377 (1937).

160. K.Bailey e E.C.Webb.
- Biochem.J. 38, 394 (1944).
161. M.Kunitz.
- J.Amer.Chem.Soc. 73, 1387 (1951).
162. T.Mann.
- Biochem.J. 38, 345 (1944).
163. H.Luers, B.N.v.Zychlinski e K.Bengston.
- Wochschr.Brau. 48, 519, 529 (1933) cf.
ref. 63.
164. P.Fleury e J.Courtois.
- C.R.Soc.Biol., 128, 465 (1938).
165. P.Fleury e J.Courtois.
- Enzymologia 5, 254 (1938).
166. K.Mayer e M.Klinga-Mayer.
- Z.Physiol.Chemie 267, 115 (1940).
167. A.Haase.
- Z.Physiol.Chemie 239, 1 (1936).
168. E.Bamann e H.Gall.
- Biochem.Z. 239, 1 (1937).
169. M.A.Swanson.
- J.Biol.Chem. 164, 685 (1952).
170. J.Roche, L. de Laronigwière e A.Laurens.
- C.R.Acad.Sci., Paris, 215, 495 (1942).
171. J.J.Gordon.
- Biochem.J. 46, 96 (1950).
172. U.S.Seal.
- Fed.Proc. 16, 351 (1956).
173. K.Lohmann e P.Schuster.
- Biochem.Z. 272, 24 (1934).
174. H.D.Jenner e H.D.Kay.
- J.Biol.Chem. 93, 733 (1931).
175. J.Roche, Nguyen-van-Thoai e J.Marcellet.
- C.R.Soc.Biol. 138, 517 (1944).

176. J.P. Ebel e L. Mehr.
- Bull. Soc. Chim. Biol. 39, 1535 (1957).
177. B. Naganna e V.K.N. Menon.
- J. Bio. Chem. 174, 501 (1948).
178. E. Malkin e O.F. Denstedt.
- Can. J. Bioch. Physiol. 34, 121 (1956).
179. N. Datta e J. Zajicek.
- Acta Haemat. 12, 81 (1954), cf. Excerpta Medica, 8, 374 (n.1871) (1955).
180. L.A. Heppel.
- "Inorganic Pyrophosphatases from Yeast" em "Methods of Enzymology - Vol. II", como ref. 59, p. 570.
181. O. Warburg e W. Christian.
- Biochem. Z. 310, 384 (1941-1942).
182. L. Bloch-Frankenthal.
- Biochem. J. 57, 87 (1954).
183. K. Bailey e E.C. Webb.
- Biochem. J. 38, 394 (1944).
184. J.J. Gordon.
- Nature 164, 579 (1949).
185. B. Naganna, A. Raman, B. Venugopol e C.E. Sripathi.
- Biochem. J. 60, 215 (1955).
186. B. Norberg.
- Acta. Chem. Scand. 4, 601 (1950).
187. V.R. Potter.
- "Tissue Homogenates" em "Methods of Enzymology - Vol. I", como ref. 59, p. 10.
188. V.R. Potter e C.A. Elvehjem.
- J. Biol. Chem. 114, 495 (1936).
189. G.H. Hogeboom.
- "Fractionation of Cell Components of Animal Tissues" em "Methods of Enzymology - Vol. I", como ref. 59, p. 16.

190. G.H.Hogeboom, W.C.Schneider e G.E.Palade.
- J.Biol.Chem. 172, 619 (1948).
191. W.C.Schneider.
- J.Biol.Chem. 176, 259 (1948).
192. W.C.Schneider e G.H.Hogeboom.
- J.Biol.Chem. 183, 123 (1950).
193. R.K.Morton.
- "Methods of Extraction of Enzymes from Animal Tissues" em "Methods of Enzymology - Vol. I", como ref. 59, p. 25.
194. A.A.Green e W.I.Hughes.
- "Protein Fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents" em "Methods of Enzymology - Vol. I", como ref. 59, p. 67.
195. C.A.Fiske e Y.Subbarow.
- J.Biol.Chem. 66, 375 (1925).
196. P.B.Hawk, B.L.Oser e W.H.Summers.
- "Practical Physiological Chemistry" 13ª edição 1954, Blakiston Company Inc., N. York, p. 605.
197. G.Gomor .
- "Preparation of Buffers for the Use in Enzyme Studies" em "Methods in Enzymology - vol. I", como ref. 59, p. 138.
198. M.Steiner.
- em "Die Methoden der Fermentforschung -vol. I", editores E.Bamann e K.Myrbaeck, Georg Thieme Verlag, Leipzig 1941, p. 781.
199. W.H.Elliott.
- em "Data for Biochemical Research", editores R.M.C.Dawson, D.C.Elliott, W.H.Elliott e K.M.Jones, Oxford Clarendon Press, Inglaterra, 1959.

200. M.Dixon e E.C.Webb.

- "Enzymes", Longmans, Green and Co., London, 1958, p. 87.

201. S.P.Colowick.

- "Adenylate Kinase (Miokinase, ADP-Phosphomutase)" em "Methods in Enzymology - vol. II" , como ref. 59, p. 598 .

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
U.F.R.G.S.

A B R E V I A T U R A S

DNA	-	Ácido desoxi-ribo-nuclêico
RNA	-	Ácido ribo-nuclêico
s-RNA	-	Ácido ribo-nuclêico solúvel
ATP	-	Adenosina-tri-fosfato (adenina-ribose-P-P-P)
ADP	-	Adenosina-di-fosfato (adenina-ribose-P-P)
AMP	-	Adenosina-mono-fosfato, ác. adenílico (adenina-ribose-5'.P)
GTP	-	Guanosina-tri-fosfato (guanina-ribose-P-P-P)
GDP	-	Guanosina-di-fosfato (guanina-ribose-P-P)
GMP	-	Guanosina-mono-fosfato (guanina-ribose-5'.P)
UTP	-	Uridina-trifosfato (uracílio-ribose-P-P-P)
UDP	-	Uridina-di-fosfato (uracílio-ribose-P-P)
UMP	-	Uridina-mono-fosfato (uracílio-ribose-5'.P)
IMP	-	Inosina-mono-fosfato (hipoxantina-ribose-5'.P)
Xantosina-5'.P	-	Xantosina-5'.fosfato
UDPG	-	Uridina-di-fosfo-glicose
UDPGA	-	Uridina-di-fosfo-ácido-glicurônico
UDP-Gal	-	Uridina-di-fosfo-galactose
UDP-Gam	-	Uridina-di-fosfo-glicosamina
UDP-Galam	-	Uridina-di-fosfo-galactosamina
UDP-Xil	-	Uridina-di-fosfo-xilose
GDP-Man	-	Guanosina-di-fosfo-manose

NMN	- Nicotinamida-mono-nucleotídio (nicotinamida-ribose-5'.P)
DPN	- Di-fosfo-piridina-nucleotídio (nicotinamida-rib-P-P-rib-adenina)
TPN	- Tri-fosfo-piridina-nucleotídio (3'.fosfo-DPN)
FMN	- Flavina-mono-nucleotídio (riboflavina-P)
FAD	- Flavina-adenina-dinucleotídio (riboflavina-P-P-adenina)
APS	- Adenosina-fosfo-sulfato
PAPS	- Fosfo-adenosina-fosfo-sulfato
Pi	- Orto-fosfato inorgânico
PPI	- Piro-fosfato inorgânico
Glicose-6,P	- Glicose-6,fosfato
Glicose-1.P	- Glicose-1.fosfato
Galactose-1.P	- Galactose-1.fosfato
Manose-1.P	- Manose-1.fosfato
Xilose-1.P	- Xilose-1.fosfato
Ribose-1.P	- Ribose-1.fosfato
5.P-ribose-1.PP	- 5.fosfo-ribose-1.pirofosfato
R-COOH	- Ácido mono-carboxílico
R-CO-P	- Acila-fosfato
R-CO-AMP	- Acila-adenosina-mono-fosfato
CoA-SH	- Coenzima A
R-Co-S-CoA	- Acila-coenzima A
EDTA	- Ácido etilena-diamino-tetra-acético
Tris	- Tris(hidroxi-metil)amino-metano
pHMB	- Para-hidroxi-mercuri-benzoato
M	- Molar (concentração da solução)
μ mol	- Micro-mol (quantidade de substância)
ΔF°	- Acréscimo de energia livre padrão

I N D I C E

CAPÍTULO I :	INTRODUÇÃO	1
A.-	<u>A origem e o papel central do pirofosfato inorgânico no metabolismo intermediário.....</u>	3
I-	Metabolização de Ácidos Graxos.....	5
II-	Metabolização de Proteínas e amino-ácidos.....	7
III-	Metabolização de Glicídios.....	10
IV-	Metabolização de Ácidos Nuclêicos e Nucleotídios.....	12
V.-	Outros processos metabólicos.....	19
B.-	<u>Destino do pirofosfato inorgânico.....</u>	22
C.-	<u>Objetivo dêste trabalho.....</u>	29
CAPÍTULO II :	<u>MATERIAL E MÉTODOS.....</u>	31
CAPÍTULO III :	<u>RESULTADOS EXPERIMENTAIS E DISCUSSÃO.....</u>	55
A.-	<u>Atividades pirofosfatásicas em tecido hepático.....</u>	56
1.	Homogeneizado hepático total - Curva de pH.....	56
2.	Fração de núcleos hepáticos - Curva de pH.....	59

3. Fração de mitocôndrias hepáticas - Curva de pH.....	62
4. Fração de microsomas hepáticas - Curva de pH.....	63
5. Fração de sobrenadante citoplasmático hepático - Curva de pH.....	65
6. Comentário comparativo sobre as curvas de pH das quatro frações sub-celulares.....	66
7. Fracionamento protéico a partir de preparação nuclear hepática.....	68
8. Estudo da fração de núcleos hepáticos...72	
a)- Efeito da variação de concentração do substrato.....	72
b)- Efeito inibitório de excesso de substrato.....	74
c)- Efeito da variação de concentração de ions Mg^{++}	79
d)- Efeito de outros ions sobre a atividade pirofosfatásica.....	82
e)- Efeito da variação do tempo de incubação.....	88
f)- Efeito da variação de temperatura de incubação e de <u>pre</u> aquecimento da preparação nuclear..	88
B.- <u>Atividades pirofosfatásicas em tecido pancreático.....</u>	89
1. Homogeneizado pancreático total	
. Curva de pH.....	90
2. Fração de núcleos pancreáticos -	
Curva de pH.....	91

3.	Fração de mitocôndrias pan- creáticas - Curva de pH.....	92
4.	Fração de microsomas pan- creáticas - Curva de pH.....	93
5.	Fração de sobrenadante cito- plásmático pancreático - Curva de pH....	94
6.	Comentário comparativo sôbre as curvas de pH das quatro forma- ções sub-celulares.....	95
7.	Estudo da fração de núcleos pancreáticos.....	97
	a)- Efeito da variação de con- centração do substrato.....	97
	b)- Efeito inibitório de exces- so de substrato.....	100
	c)- Efeito da variação de con- centração dos ions Mg^{++}	101
	d)- Efeito de outros ions sôbre a atividade pirofosfatásica.....	102
	e)- Efeito da variação do tempo de incubação.....	103
	f)- Efeito da variação de tem- peratura de incubação e de preaquecimento da prepara- ção nuclear.....	104
CAPÍTULO IV :	<u>CONCLUSÃO E SUMÁRIO</u>	105
	Sumário.....	110
CAPÍTULO V :	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS....	111
	Abreviaturas.....	126